

**Tuberkulose bei Rindern (*M. caprae*)  
aus den Jahren 2009 bis 2014.**

**Untersuchungen zur Verteilung säurefester Bakterien im Gewebe  
und Beschreibung morphologischer Veränderungen**

von Birte Rieseberg



Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Tuberkulose bei Rindern (*M. caprae*) aus den Jahren 2009 bis 2014.**

**Untersuchungen zur Verteilung säurefester Bakterien im Gewebe und  
Beschreibung morphologischer Veränderungen**

von Birte Rieseberg  
aus Frankfurt am Main

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Mitbetreuung durch: Dr. Miriam Leipzig



**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

**Korreferenten:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger  
Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtlbauer

Tag der Promotion: 06. Februar 2016



# INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 Geschichte der Tuberkulose .....	3
2.2 Ätiologie.....	5
2.2.1 Klassifikation und Morphologie.....	5
2.2.2 Virulenz und Tenazität.....	7
2.2.2.1 Faktoren, die einen intrazellulären Parasitismus ermöglichen.....	7
2.2.2.2 Zellwandbestandteile.....	9
2.2.2.3 Enzyme.....	11
2.2.2.4 Tenazität.....	11
2.2.3 Übertragung und Erregerausscheidung.....	12
2.2.4 Vorkommen.....	13
2.3 Immunantwort.....	14
2.3.1 Lösliche Faktoren.....	14
2.3.1.1 Zytokine.....	14
2.3.1.2 Antikörper.....	15
2.3.2 Zelluläre Immunantwort.....	15
2.3.2.1 T-Lymphozyten.....	15
2.3.2.2 Neutrophile Granulozyten.....	17
2.3.2.3 Makrophagen.....	17
2.4 Pathogenese.....	18
2.5 Klinik.....	20
2.6 Diagnose.....	21
2.6.1 Tuberkulintest.....	21
2.6.2 $\gamma$ -Interferontest.....	23
2.6.3 ELISA zum Nachweis von Antikörpern.....	23
2.6.4 Bakteriologische Untersuchung.....	24
2.6.5 PCR.....	25
2.6.6 Pathologie.....	26
2.6.6.1 Makroskopie.....	26
2.6.6.1.1 Lunge.....	26
2.6.6.1.2 Euter.....	28
2.6.6.1.3 Geschlechtsorgane.....	28
2.6.6.1.4 Darm.....	29
2.6.6.1.5 Leber.....	29
2.6.6.1.6 Niere, Milz, Knochen, Hirn und Meningen.....	29
2.6.6.1.7 Perlsucht.....	30
2.6.6.1.8 Lymphknoten.....	30
2.6.6.2 Histologie.....	30
2.6.6.2.1 Histopathologische Veränderungen.....	30
2.6.6.2.2 Erregernachweis in der Ziehl-Neelsen-Färbung.....	31
2.6.6.2.3 Fluoreszenzfärbungen.....	33
2.6.6.2.4 Immunhistologie.....	34
2.6.6.2.5 In situ-Hybridisierung.....	34
2.6.6.2.6 Elektronenmikroskopie.....	34
2.7 Differentialdiagnosen.....	35
2.8 Therapie.....	36
2.9 Bekämpfungsprogramme.....	36
2.10 Bovine Tuberkulose beim Menschen.....	37
3 MATERIAL UND METHODEN.....	39
3.1 Untersuchungsmaterial.....	39

3.1.1	Fixierung der Proben und Anfertigen von Bildern.....	40
3.1.2	Vorbereitung der Proben für die Histologie.....	40
3.2	Methoden.....	40
3.2.1	Paraffineinbettung und Herstellung der Schnitte .....	40
3.2.2	Vorbereitung zur Färbung .....	41
3.2.3	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	42
3.2.4	Säurefeste Färbung nach Fite-Faraco.....	42
3.2.5	Mikroskopische Untersuchung der Präparate.....	43
4	ERGEBNISSE.....	45
4.1	Angaben zum Untersuchungsmaterial.....	45
4.2	Makroskopische Befunde.....	45
4.2.1	Vorkommen der Makro-Muster im Probenmaterial.....	49
4.3	Histopathologische Befunde.....	51
4.4	Ergebnisse der Fite-Faraco-Färbung.....	59
4.4.1	Verteilung säurefester Stäbchen in den Organen und Lymphknoten.....	59
4.4.2	Verteilung säurefester Stäbchen in den Läsionen.....	60
5	DISKUSSION.....	69
5.1	Makroskopische Befunde.....	69
5.2	Interpretation histopathologischer Befunde.....	70
5.3	Interpretation der Ergebnisse der Fite-Faraco-Färbung.....	72
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	75
7	SUMMARY.....	77
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	79
8.1	Literatur.....	79
8.2	Gesetze, Verordnungen und Richtlinien.....	98
8.2.1	Gesetze und Verordnungen.....	98
8.2.2	EU-Richtlinien und -Verordnungen.....	98
9	ANHANG.....	99
9.1	Tabellen.....	99
9.2	Lösungen zur Fixierung der Proben .....	107
9.2.1	Klotz-Lösung.....	107
9.3	Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte.....	107
9.3.1	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	107
9.3.1.1	Eosin-Lösung.....	107
9.3.1.2	0,5%-ige HCl-Alkohol-Gebrauchslösung.....	107
9.3.2	Lösungen zur Vorbereitung für die FF.....	107
9.3.2.1	Xylol-Paraffinöl.....	107
9.3.3	Fite-Faraco-Färbung.....	108
9.3.3.1	1%-ige HCl-Alkohol-Stammlösung.....	108
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	109
11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	111
12	DANKSAGUNG.....	113

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqua dest.	Aqua destillatum
ca.	circa
cm	Centimeter
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Ezyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii (und andere)
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
g	Gramm
gr.	griechisch
h	Stunde/Stunden
IE	internationale Einheiten
l	Liter
Ln.	Lymphonodus
LN	Lymphknoten
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
PCR	Polymeraskettenreaktion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
s.o.	siehe oben
v. Chr.	vor Christus
VO	Verordnung
z.B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer



## 1 EINLEITUNG

Die Rindertuberkulose ist weltweit nicht nur als Tierseuche von großer Bedeutung, sondern auch aufgrund ihres zoonotischen Potentials. Ihre Erreger, die Bakterienarten *Mycobacterium (M.) bovis* und *M. caprae*, sind in der Lage beim Menschen eine Erkrankung gleich der humanen Tuberkulose, die verursacht wird durch *M. tuberculosis*, hervorzurufen. Jährlich erkranken und sterben Millionen von Menschen an dieser chronisch auszehrenden Krankheit. Aufgrund ihrer großen Bedeutung wurden seit Anfang des letzten Jahrhunderts in vielen Ländern Bekämpfungsprogramme entwickelt und etabliert mit dem Ziel, die Seuche zu tilgen.

Nach erfolgreicher Durchführung solcher Programme gilt Deutschland seit 1996 als amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose. Trotzdem werden seither wiederholt Erkrankungsfälle bei Rindern dokumentiert (Leipig et al., 2009).

Laut der „Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes“ (Tuberkulose-VO) in der Fassung vom 13.07.2013 besteht ein Tuberkuloseverdacht, wenn das Ergebnis einer klinischen oder einer pathologisch-anatomischen Untersuchung sowie eines Tuberkulin- oder  $\gamma$ -Interferontests darauf hindeutet. Zur Bestätigung ist ein bakteriologischer Nachweis des Erregers oder ein Nachweis mittels Nukleinsäure-amplifikationstechnik zu erbringen. Für die bakteriologische Untersuchung sind laut OIE-Handbuch (Office International des Epizooties, Weltorganisation für Tiergesundheit) sowohl die Anzüchtung auf bestimmten Kulturmedien, als auch die mikroskopische Darstellung der Bakterien in der Ziehl-Neelsen- oder einer anderen Spezialfärbung geeignet.

Für die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren von 2009 bis 2014 Probenmaterial von klinisch unauffälligen Rindern aus deutschen Tierbeständen gesammelt, bei denen jedoch aufgrund des Ergebnisses eines durchgeführten intradermalen Tuberkulintests eine Tuberkuloseerkrankung vermutet wurde. Die Tiere wurden in der Tierkörperbeseitigungsanlage in Kraftisried obduziert und es wurden Proben von makroskopisch veränderten Lokalisationen entnommen. Dies waren im einzelnen Proben der Lunge, des Darms, der Leber, des Mesenterial-, Mediastinal-, Portal- und

Retropharyngeallymphknoten. Am bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit wurde mittels bakteriologischer Untersuchung und Nukleinsäureamplifikationstechnik *M. caprae* als Erreger nachgewiesen.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen wurden gefördert aus Mitteln des Bayerischen Staatsministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Forschungsvorhaben "Bovine Tuberkulose im Allgäu" unter der Forschungsnummer (A/13/37). Die Bearbeitung der Proben wurde in Zusammenarbeit mit Frau Öztürk durchgeführt, für deren Untersuchungen im Rahmen ihres Promotionsprojektes diese ebenfalls als Ausgangsmaterial dienten (Öztürk, in Vorbereitung).

Ziel dieser Arbeit ist die pathohistologische Beschreibung der Veränderungen in den Proben dieser natürlich infizierten Rinder und die Beschreibung der Verteilung und Lokalisierung des Erregers innerhalb dieser Veränderungen. Dafür wurde eine modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung, die säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, angewandt. Von Interesse war bei der Untersuchung des Materials vor allem die Fragestellung, in welcher Art von Veränderung und wo innerhalb dieser am sichersten Bakterien anzutreffen sind.



## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Geschichte der Tuberkulose

Die Tuberkulose ist eine sehr alte Krankheit, die in der Geschichte weit zurückreicht. Im Jahr 2004 fand ein internationales Forscherteam in einer Provinzstadt in der Türkei Einzelteile des Schädels eines Homo erectus. Dieses 500.000 Jahre alte Fundstück weist an seiner Innenseite Läsionen auf, die sehr charakteristisch für eine Leptomeningitis tuberculosa, also eine Hirnhautentzündung im Zuge einer Tuberkuloseerkrankung, sind. Den Forschern zufolge gehörte der Schädel zu einem aus Afrika stammenden jungen Mann (Kappelman et al., 2008).

In der „Natural Trap Cave“ in Wyoming (USA), einer Schachthöhle, der über 100.000 Jahre lang verschiedene Tierarten auf Wanderschaft zum Opfer fielen, wurden unter anderem Knochen eines ca. 17.000 Jahre alten Bisons gefunden. Diese wiesen klassische aber seltene Spuren einer granulomatösen Entzündung auf. Es handelt sich dabei um unterminierte subchondrale Oberflächen mit perierosiver Osteopenie. Auf gegebenen Verdacht hin wurden Proben der betroffenen Gelenkflächen auf das Vorkommen des Tuberkuloseerregers untersucht. Es gelang darin DNA eines Mitglieds des *M. tuberculosis*-Komplexes nachzuweisen, welches nach Spoligotypingmuster zu urteilen am ehesten mit *M. tuberculosis* oder *M. africanum* verwandt ist (Rothschild et al., 2001).

Bei der Untersuchung der ca. 9.000 Jahre alten Skelette einer jungen Frau und eines Säuglings aus Atlit Yam, einer der ältesten bekannten jungsteinzeitlichen Siedlungen an der Mittelmeerküste, in der Ackerbau und Viehzucht betrieben wurden, wurden Hinweise auf Tuberkulose gefunden. Mittels PCR konnte in den untersuchten Knochen DNA des *M. tuberculosis*-Komplex nachgewiesen werden; die größte Ähnlichkeit besteht zu rezenten Linien von *M. tuberculosis*. Sowohl die junge Frau als auch der Säugling, bei dem es sich vermutlich um ihr Kind handelt, sind sehr wahrscheinlich an der Tuberkuloseinfektion gestorben (Hershkovitz et al., 2008).

Eine weitere interessante Entdeckung ergab sich durch die Untersuchung von drei peruanischen menschlichen Skeletten, deren Alter auf ungefähr 1.000 Jahre datiert

wurde. Die Knochen weisen Läsionen auf, die mit Tuberkulose in Verbindung gebracht werden können. Darin konnte Mykobakterien-DNA nachgewiesen werden, die am ehesten der heutiger *M. pinnipedii* Stämmen ähnelt. Da dieser Erreger heute nur bei Robben und Seelöwen vorkommt, vermuten die Entdecker, dass vor rund 2.500 Jahren die Tuberkulose über Robben aus Afrika nach Amerika eingeschleppt wurde. Die Ansteckung dieser drei Menschen erfolgte vermutlich durch den Verzehr des Robbenfleisches. Nach Annahmen der Forscher breitete sich der Erreger weiter aus, bis er schließlich durch den europäischen Stamm, eingeschleppt durch die Spanier, verdrängt wurde (Bos et al., 2014).

Mumienfunde aus dem alten Ägypten (ca. 1.500 - 1000 v. Chr.) belegen weitere „historische“ Tuberkulosefälle (Nerlich et al., 1997; Zimmerman, 1979). Im alten Griechenland beschrieb Hippocrates (460-370 v. Chr.) die „Phthisis“ (griechisch für „Schwund“, woraus der Begriff „Schwindsucht“ entstand) als eine der häufigsten Erkrankungen seiner Zeit, die üblicherweise zum Tode führte (Hippokrates). In Geweben von Rindern, Schafen und Schweinen fand er Granulome. Zur Zeit der Renaissance wurde dann auch der menschliche Körper eingehender erforscht und erste Autopsien durchgeführt. Bald entstanden die ersten pathoanatomischen Beschreibungen der Tuberkulose (Herzog, 1998). Im Jahr 1720 äußerte der Engländer Benjamin Marten zum ersten Mal die Vermutung, dass Schwindsucht durch kleine Lebewesen verursacht werden könnte (Marten, 1720). Lange Zeit war unklar, ob die Erkrankung infektiöser oder hereditärer Ursache ist. 1865 publizierte der Franzose Jean Antoine Villemin seine Arbeit, in der er darlegte, dass Schwindsucht von Mensch oder Rind auf andere Tierarten (u.a. Kaninchen und Meerschweinchen) übertragen werden kann (Daniel, 2015).

Die Frage nach der Ursache der Tuberkulose konnte 1882 durch Robert Kochs Entdeckungen gänzlich geklärt werden. Er schaffte es, den Erreger in tuberkulösem Material anzufärben und somit unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Diese „Tuberkelbazillen“ identifizierte er als Bakterien innerhalb der Läsionen im Gewebe (Koch, 1882).

Damit sah man auch die Hypothese bestätigt, dass Milch für Kinder eine Ansteckungsquelle darstellte, da Kinder, die Kuhmilch tranken häufiger tuberkulöse Läsionen entwickelten als Kinder, die Muttermilch bekamen. Daraufhin wurde die Milch wärmebehandelt (pasteurisiert). Nach weiteren Untersuchungen wurde

herausgefunden, dass es Unterschiede zwischen den Tuberkelbazillen aus Rindern und aus Menschen gibt, sodass man nun von humanen Tuberkelbazillen und bovinen Tuberkelbazillen sprach (Grange & Yates, 1994).

Im Jahr 1890 gewann Robert Koch ein Filtrat aus abgetöteten flüssigen Kulturen von *M. tuberculosis*, das Tuberkulin (Pritchard, 1988). Da es seinen eigentlichen Zweck als Impfstoff nicht gut erfüllte, wurde es aufgrund seiner Eigenschaft, in infizierten Individuen Fieberschübe auszulösen, zur Diagnostik sowohl bei Menschen als auch bei Rindern verwendet. Somit konnten Infektionen aufgedeckt werden, auch wenn keine Symptome auftraten (Monaghan et al., 1994). Mit der Entdeckung von Antibiotika und deren stetiger Weiterentwicklung war der größte Schritt in der Bekämpfung der humanen Tuberkulose getan (Herzog, 1998). Zur Tilgung der Rindertuberkulose wurden nun verschiedene Bekämpfungsprogramme entwickelt, deren Kernpunkte das Töten infizierter Tiere, die Pasteurisierung von Milch und die Kontrolle der Tierkörper am Schlachthof waren (Pritchard, 1988).

## 2.2 Ätiologie

### 2.2.1 Klassifikation und Morphologie

Mykobakterien sind grampositive, unbewegliche Stäbchen, deren Zellwand Mykolsäuren enthält, was ihnen Säure- und Alkoholfestigkeit verleiht. Sie sind gerade oder leicht gebogen, haben eine Größe von 0,2 - 0,7 x 1,0 - 10,0 µm und können verzweigte Filamente bilden, die an Pilze erinnern („múkēs“/“myces“ gr., Pilz). Außerdem zeichnen sie sich durch obligat aerobes Wachstum aus. Die Gattung *Mycobacterium* umfasst über 190 Spezies, die in bestimmte Gruppen eingeteilt werden (Valentin-Weigand, 2011):

- ◆ Erreger des Tuberkulosekomplexes: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis BCG*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* und *M. orygis*
- ◆ Erreger der Lepra: *M. leprae*
- ◆ *M. avium*-Komplex: *M. avium avium*, *M. avium paratuberculosis*
- ◆ MOTT (Mycobacteria other than tubercle bacilli): saprophytär lebende Arten; sie werden gemeinsam mit dem *M. avium*-Komplex in sogenannte Runyon-Gruppen aufgeteilt (Tabelle 1)

**Tabelle 1:** Überblick über die Einteilung der Mykobakterien in Runyon-Gruppen mit dazugehörigen kulturellen Merkmalen und Mykobakterienspezies (Valentin-Weigand, 2011; modifiziert)

Runyon-Gruppe	Kulturelle Merkmale	Spezies
I	Langsam wachsend, Pigmentbildung bei Licht, photochromogen	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>
II	Langsam wachsend, Pigmentbildung in Dunkelheit, skotochromogen	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i>
III	Langsam wachsend, keine Pigmentbildung	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i>
IV	Schnell wachsend	<i>M. smegmatis</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. phlei</i>

Das in dieser Arbeit behandelte Bakterium *M. caprae* gehört als einer der Erreger der bovinen Tuberkulose zum Tuberkulosekomplex. Lehmann und Neumann (1896) fassten erstmals mehrere Arten in der Gattung „Mycobacterium“ zusammen, die Entdeckung von *M. caprae* und die Einordnung in diese Gattung gehen auf Aranaz und Mitarbeiter (1999) zurück. Sie schlugen für die von ihnen entdeckten Organismen den Namen *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov. vor. Später erfolgte der Vorschlag zur Umbenennung in *M. bovis* subsp. *caprae* aufgrund größerer Ähnlichkeit zu *M. bovis* im Wachstumsverhalten, in biochemischen Eigenschaften und genetischen Komponenten (Niemann et al., 2002). Aufgrund weiterer Untersuchungen (Aranaz et

al., 2003) wurde dem Bakterium der Speziesstatus als *M. caprae* zuerkannt.

### **Taxonomische Klassifikation:**

**Stamm** Actinobacteria

**Klasse** Actinobacteria

**Unterklasse** Actinobacteridae

**Ordnung** Actinomycetales

**Unterordnung** Corynebacterineae

**Familie** Mycobacteriaceae

**Gattung** Mycobacterium (Lehmann & Neumann, 1896)

**Art** Mycobacterium caprae (Aranaz et al., 1999)

### **2.2.2 Virulenz und Tenazität**

An dieser Stelle sollen nur einige ausgewählte Virulenzfaktoren beschrieben werden, da das Spektrum der bekannten Faktoren mittlerweile sehr groß ist (Forrellad et al., 2013).

#### **2.2.2.1 Faktoren, die einen intrazellulären Parasitismus ermöglichen**

Zielzellen des intrazellulären Parasitismus sind vor allem Makrophagen, wobei das Bakterium an verschiedene Rezeptoren auf deren Oberfläche, unter anderem an die Komplement-Rezeptoren (CR1, CR3 und CR4), den Fibronectin-Rezeptor, den Mannose-Rezeptor (Ernst, 1998; Toossi & Ellner, 1998), die Sp-A-Rezeptoren, den CD14-Rezeptor oder den Fcγ-Rezeptor (Ernst, 1998), andocken kann.

Die Bindung an die Komplement-Rezeptoren erfolgt über die Aktivierung der Komplement-Kaskade, wodurch die Bakterien mit C3b und C3bi opsonisiert werden. So markiert, können die Bakterien über die Komplement-Komponenten an die Rezeptoren binden (wobei C3b als Ligand für CR1 und C3bi für CR3 und CR4 dient) und werden in einem von Zellmembran umschlossenen Phagosom in den Makrophagen aufgenommen (Hirsch et al., 1994; Schlesinger, 1993; Schlesinger et al., 1990).

Als Ligand für den Mannose-Rezeptor dient das Lipoarabinomannan mit seinem terminalem Mannoserest, welches ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von

Mykobakterien ist (Schlesinger et al., 1994; Schlesinger et al., 1996).

Der Mechanismus der Bindung und die Aufnahme von *M. tuberculosis* in den Makrophagen vermittelt durch surfactant protein A (Sp-A) sind noch nicht völlig geklärt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es durch Sp-A vermehrt zu einer Bindung und Aufnahme kommt (Downing et al., 1995). Da Sp-A an *M. tuberculosis* bindet, wird vermutet, dass es als ein Opsonin fungiert. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass für eine Sp-A vermittelte Aufnahme in den Makrophagen noch andere Mechanismen in Frage kommen, da diese im Zusammenhang mit Sp-A auch vermehrt über Fc- und Komplement-Rezeptoren (Tenner et al., 1989) sowie Mannose-Rezeptoren (Gaynor et al., 1995) erfolgt.

Lipoarabinomannan (LAM) bindet auch an das Glykoprotein CD14, das als wichtiger Rezeptor für Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien bekannt ist (Pugin et al., 1994).

Zirkulierende Antikörper der Immunglobulinklasse G, die gegen *M. tuberculosis* gerichtet sind, können Mykobakterien opsonisieren und so eine Aufnahme über den Fcγ-Rezeptor in Makrophagen vermitteln. Über diesen Weg werden sie in Phagosomen aufgenommen, die rasch mit Lysosomen verschmelzen (Armstrong & Hart, 1975).

Nach der Aufnahme in die Zielzelle, verweilen die Bakterien dort in Phagosomen und beeinflussen einige Zellfunktionen (Sakamoto, 2012).

Lipoarabinomannan (LAM), welches bereits als Ligand von Oberflächen-Rezeptoren erwähnt wurde, ist ein immunogenes Glykolipid der Zellwand von Mykobakterien (Hunter et al., 1986) und scheint eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung von Makrophagen Effektor-Funktionen zu spielen (Chan et al., 1991). Die Untersuchungen von Chan und Mitarbeitern (1991) haben ergeben, dass LAM als Fänger toxischer Sauerstoffradikale dient, die Proteinkinase C- (ein wichtiges Element für die Signaltransduktion in der Aktivierung von Makrophagen) Aktivität hemmt und die Transkription bestimmter durch IFN-γ regulierter Gene einschränkt. Es wird vermutet, dass LAM so die Aktivierung von Makrophagen und ihrer Effektormechanismen hemmt (Chan et al., 1991).

Eine weitere wichtige Strategie ist das Entkommen aus dem Phagolysosom (McDonough et al., 1993), sowie das Verhindern der Phagosom- und Lysosomverschmelzung durch Hemmung der Reifung des Phagosoms (Via et al., 1997). McDonough und Mitarbeiter (1993) konnten in ihrem Versuch zeigen, dass bereits ab

Tag 1 post infectionem vereinzelte Bakterien beginnen, die Membran von Phagolysosomen hervorstülpen und, kleine Vesikel bildend, abzuschnüren. Dies wird anscheinend durch Anteile der Bakterienoberfläche vermittelt, die mit der Membran des Phagolysosoms in Kontakt treten. Diese Vesikel verschmolzen nicht mit sekundären Lysosomen. Somit konnten einige Zeit nach der Infektion vermehrt vereinzelte Mykobakterien in kleinen Vesikeln mit dicht anliegenden Membranen gefunden werden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen im Laufe des Versuchs ist zu sehen, dass nach einigen Tagen die Bakterien aus ihnen in das Zytoplasma entkommen können (McDonough et al., 1993).

#### **2.2.2.2 Zellwandbestandteile**

Die Zellwand der Mykobakterien folgt außen auf ihre Zellmembran. Sie besteht aus einer Schicht Peptidoglykan, an das Arabinogalaktan kovalent gebunden ist, woran wiederum Mykolsäuren gebunden sind. Als letzte Schicht schließen sich Lipide mit lang- und kurzkettigen Fettsäuren an. Dazwischen finden sich Proteine: das Phosphatidylinositolmannosid (PIM), Phthiocerole, Lipomannan (LM) und LAM (Brennan, 2003).

Bei den Mykolsäuren handelt es sich um  $\beta$ -Hydroxy-Fettsäuren mit langen  $\alpha$ -Alkyl-Seitenketten (Asselineau & Lederer, 1950). Von ihnen hängt die Säurefestigkeit der Mykobakterien in der Ziehl-Neelsen-Färbung ab (Berg, 1953). Des weiteren sorgen sie für Widerstandsfähigkeit gegen chemische Einflüsse, sind kaum durchlässig für hydrophobe Antibiotika (Nikaido, 1994) und schützen die Bakterienzelle vor Austrocknung (Barry & Mdluli, 1996). Sie spielen auch als Bestandteil des Cord-Faktors in der Pathogenese der Tuberkulose eine wichtige Rolle (s. weiter unten).

Eine andere Gruppe der Zellwandlipide, die Sulfolipide (SL), bei denen es sich um sulfatierte Glykolipide handelt, steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Virulenz der Mykobakterien. Es konnte gezeigt werden, dass sie in Makrophagenkulturen die Fusion von Phagosom und Lysosom verhindern (Goren et al., 1976), sowie (gilt für Sulfolipid-1) in Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) die Produktion von Superoxidanionen und damit deren Funktion als Fresszellen beeinflussen (Zhang et al., 1988).

Ebenfalls eine wichtige Gruppe der Zellwandlipide sind die Phthiocerole. Die

Phthioceroldimycolate (DIM) werden von allen Arten des *M. tuberculosis*-Komplex gebildet und sind an der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von *M. tuberculosis* in Makrophagen von Menschen beteiligt, indem deren Plasmamembran reorganisiert wird. Dieser Mechanismus beeinflusst ebenfalls die pH-Wert-Senkung im Phagosom (Astarie-Dequeker et al., 2009).

Phosphatidylinositol (PI) sowie davon abgeleitete Stoffe wie PIM, LM und LAM sind essentielle Bestandteile der Mykobakterienzellwand (Jackson et al., 2000). Für einige PIM-Verbindungen (vor allem Acylphosphatidylinositolhexamannosid (AcPIM<sub>6</sub>)) konnten in einem Versuch immunmodulatorische Eigenschaften nachgewiesen werden. AcPIM<sub>6</sub> induziert erhöhte Konzentrationen von Interferon- $\gamma$  in mononukleären Blutzellen von Rindern und zusammen mit zwei weiteren PIM-Verbindungen führt es zu vermehrter Proliferation von bovinen mononukleären Blutzellen. Dabei stimuliert es (AcPIM<sub>6</sub>) insbesondere die Proliferation der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Pirson et al., 2015).

Trehalose 6,6'-Dimycolat (TDM), auch als Cord-Faktor bezeichnet, ist ein Glykolipid der Zellwand von Mykobakterien, das ihnen ermöglicht, sich strangförmig zusammenzulagern (Sakamoto et al., 2013). Jedoch scheint es noch mehr Funktionen in der Pathogenese der Tuberkulose zu übernehmen. So wurde in der Studie von Sakamoto und Mitarbeitern (2013) festgestellt, dass TDM Matrix Metalloproteinasen (MMP) aktiviert, im konkreten Fall MMP-9. Diese spielen eine entscheidende Rolle beim Abbau der Bindegewebskapsel um tuberkulöse Granulome, wodurch der Erreger aus dem abgekapselten Granulom entkommen kann (Sakamoto et al., 2013).

Außerdem verhindert es die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom im Makrophagen und die Absenkung des pH-Wertes im Phagolysosom (Indrigo et al., 2003; Spargo et al., 1991), was zu ihrem Überleben in der Fresszelle beiträgt.

Weiterhin spielt TDM eine wichtige Rolle in der Entstehung von verkäsenden Granulomen, sowohl aufgrund seiner Toxizität, als auch durch eine Stimulation der zellulären Immunantwort (Hunter et al., 2006).

Die Rolle von LAM als Virulenzfaktor wurde bereits weiter oben (unter 2.2.2.1) beschrieben.



### 2.2.2.3 Enzyme

Über eine Adenylatzyklase erhöht *M. tuberculosis* die Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) im Makrophagen. Dieses ist ein wichtiger *second messenger* in einer Signaltransduktionskaskade. Durch den Eingriff des Bakteriums in diesen Prozess kommt es zu einer frühen Sekretion des proinflammatorischen Zytokins Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), das unter anderem die Entstehung verkäsender Nekrosen und die Granulombildung fördert (Agarwal et al., 2009).

Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) und reaktive Stickstoffverbindungen (RNS) werden von Makrophagen produziert und haben antimikrobielle Wirkung. Zu ihnen zählt auch das Superoxidanion ( $O_2^-$ ), welches durch die Superoxiddismutase in molekularen Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgewandelt wird, wodurch sein toxischer Effekt aufgehoben wird. In Mykobakterien gibt es zwei wichtige Vertreter dieses Enzyms, die SodA und die SodC, wobei SodC vor allem dem Schutz vor extrazellulären Superoxiden zu dienen scheint (Piddington et al., 2001).

Die Aufgabe der mykobakteriellen Katalase, scheint vor allem im Abbau der im Zuge des *respiratory burst* vom Makrophagen produzierten Peroxide zu liegen (Ng et al., 2004). Außerdem weist sie noch eine Peroxidase- (Heym et al., 1993) und eine Peroxynitritase-Aktivität (Wengenack et al., 1999) auf.

### 2.2.2.4 Tenazität

Die Tenazität der Mykobakterien ist maßgeblich durch ihren spezifischen Wandaufbau bedingt, der sie recht widerstandsfähig gegen äußere Einflüsse macht. So überleben sie im Trachealschleim 30 - 40 Tage, in eingetrocknetem Auswurf sogar bis zu 100 Tage. Unter günstigen Bedingungen (feucht, nicht zu warm) kann der Erreger in der Außenwelt (auf Weiden z.B. im Kot) mehrere Monate lang überleben und infektionstüchtig bleiben. Bedeutsam aufgrund des zoonotischen Potenzials ist die Tenazität von Mykobakterien in Rohmilch und daraus stammenden Produkten. So bleiben sie z.B. in Joghurt bis zu 14, in Weichkäsen bis zu 100 Tage lang infektiös (Trautwein, 2006). Als Verfahren zur Abtötung des Erregers in der Milch haben sich daher die Kurzzeitpasteurisierung (71 - 74°C) und die Hoherhitzung (80 - 85°C) bewährt (Valentin-Weigand, 2011).

### 2.2.3 Übertragung und Erregerausscheidung

Es gibt verschiedene Wege, über die Erreger des Tuberkulosekomplexes übertragen werden können. So kann die Übertragung durch direkten Kontakt zwischen Tieren über kontaminierte Sekrete (aus dem Respirationstrakt infizierter Rinder) oder Milch (Neill et al., 1994), sowie indirekt über kontaminiertes Futter, Tränken, Weiden und Einatmung erregerhaltigen Staubs (eingetrocknetes Sputum) erfolgen (Trautwein, 2006). Dabei muss die Kontamination von Weiden und Tränken nicht zwangsweise von anderen infizierten Rindern ausgehen, sondern sie kann auch durch Wildtiere geschehen (Trautwein, 2006). Bekannte Wildreservoirse weltweit sind Dachse (Gavier-Widen et al., 2001), Wildschweine (Garcia-Jimenez et al., 2013), Rotwild (Carstensen & DonCarlos, 2011), afrikanische Büffel (Laisse et al., 2011) und Fuchskusus bzw. Possums (Jackson et al., 1995). Wenn die Reproduktionsorgane infiziert sind, ist eine Übertragung auf diesem Wege ebenfalls möglich (Francis, 1972).

Viele Feldstudien haben gezeigt, dass der aerogene Infektionsweg gegenüber dem alimentären der vorherrschende ist, da sich die meisten Läsionen im oberen und unteren Respirationstrakt und den zugehörigen Lymphknoten finden (Corner, 1994; Francis, 1958; Whipple et al., 1996).

Die Ausscheidung von *M. bovis* mit dem Kot, welche zu einer Kontamination der Umgebung führt, konnte bei experimentell infizierten Rindern nachgewiesen werden. Jedoch wird angenommen, dass dies überwiegend aufgrund abgeschluckten Exsudats aus dem Respirationstrakt erfolgt (Cassidy et al., 1998; Neill et al., 1988a). Des weiteren kann es durch die Aufnahme von Milch aus erkrankten Eutern durch Kälber zu einer alimentären Infektion kommen (Evangelista & de Anda, 1996). Eine kongenitale Infektion gehört ebenfalls zu den seltenen Übertragungswegen (Stamp, 1944).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass *M. bovis* vor allem über Nasensekret und Trachealschleim ausgeschieden wird (McIlroy et al., 1986; Neill et al., 1988a; Neill et al., 1989; Neill et al., 1988b). Dies bezieht sich sowohl auf experimentell infizierte Tiere (Neill et al., 1988a; Neill et al., 1989), als auch auf zufällig ausgewählte und positiv auf Tuberkulose getestete Tiere (McIlroy et al., 1986; Neill et al., 1988b). Wie oben bereits erwähnt, konnte bei einigen dieser Tiere (experimentell infiziert) auch eine Ausscheidung über den Kot nachgewiesen werden.

In der Studie von Neill und Mitarbeitern (1988b) wurde bei 4 von 25 Tieren mit

tuberkulösen Läsionen in Lymphknoten (Retropharyngeal-, Parotis- und Bronchiallymphknoten) *M. bovis* aus Nasensekret isoliert. Bei nur einem davon wurden auch Läsionen in der Lunge festgestellt.

Von epidemiologischer Bedeutung ist die Tatsache, dass einige Zeit nach experimenteller Infektion von Tieren mit *M. bovis* der Erreger für einige Zeit konstant im Nasensekret nachgewiesen werden kann. Danach erfolgt die Ausscheidung intermittierend (Neill et al., 1988a; Neill et al., 1989).

Weiterhin konnte *M. bovis* in Sekreten des Respirationstraktes von drei Tieren nachgewiesen werden (Experiment und Feldstudie), deren Hauttest ein negatives Ergebnis ergab (Neill et al., 1992).

#### **2.2.4 Vorkommen**

Die Tuberkulose des Rindes ist eine weltweit verbreitete Tierseuche. Zur Zeit tritt sie in Europa gehäuft in Irland, Spanien und Großbritannien (inklusive Nordirland) auf (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2015).

Deutschland ist seit dem 1. Juli 1996 amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose (Entscheidung 2003/467/EG, nach Aufhebung der Entscheidung 1999/467/EG, vormals Entscheidung 97/76/EG). Tuberkulosefrei bedeutet, dass in mehr als 99,9 % der Rinderhaltungsbetriebe in Deutschland Rindertuberkulose innerhalb eines Jahres nicht festgestellt wurde. Trotzdem werden seit 1996 jedes Jahr in manchen Betrieben infizierte Rinder registriert, seit 2007 sogar mit einer leicht steigenden Tendenz, vor allem im Voralpenraum. Hierbei scheint die Rotwildpopulation eine wichtige Rolle zu spielen (Friedrich-Loeffler-Institut, 2013).

Auch die Tuberkulose des Menschen ist weltweit verbreitet. 2013 traten die meisten Neuerkrankungen in Südostasien und der westlichen Pazifikregionen auf. Insgesamt erkrankten im Jahr 2013 9 Millionen Menschen an Tuberkulose (davon 550.000 Kinder), 1,5 Millionen starben daran (World Health Organisation (WHO), 2015).

## 2.3 Immunantwort

### 2.3.1 Lösliche Faktoren

#### 2.3.1.1 Zytokine

Ein wichtiges Zytokin im Verlauf der Tuberkulose ist das Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), welches zur Aktivierung von Makrophagen führt (Pollock & Neill, 2002). Dadurch werden sie angeregt, reaktive Sauerstoff- (ROI) und reaktive Stickstoffverbindungen (RNI) zu produzieren, die zur Abtötung des Erregers führen sollen (Ding et al., 1988). IFN- $\gamma$  wird vor allem von T-Helferzellen Typ 1 (Th1-Zellen), CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert und sezerniert (Martinez et al., 2009). Ein Mangel an IFN- $\gamma$  bei Mäusen führt so beispielsweise zu einer deutlicheren Anfälligkeit für Infektionen mit *M. tuberculosis* (Flynn et al., 1993).

TNF- $\alpha$ , bei dem es sich ebenfalls um ein Zytokin, beteiligt an der Immunreaktion gegen Tuberkulose handelt, regt, gemeinsam mit IFN- $\gamma$ , Makrophagen zur RNI-Produktion und Aktivierung tuberkulostatischer Mechanismen an (Flesch & Kaufmann, 1990). Außerdem ist es an der Entstehung von Granulomen beteiligt, zum einen, indem es selbst Leukozyten anlockt, zum anderen, indem es zur Produktion weiterer Chemokine führt (Flynn et al., 1995).

Interleukin-12 (IL-12) wird nach der Phagozytose von *M. tuberculosis* durch den Makrophagen von diesem freigesetzt (Ladel et al., 1997). Es treibt die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T-Helferzellen Typ 1 an und sorgt so für eine verstärkte IFN- $\gamma$  Produktion (Cooper et al., 1995).

T-Helferzellen Typ 2 (Th2-Zellen) produzieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 (Schluger & Rom, 1998). IL-4 scheint laut einer Studie einen modulierenden Einfluss auf die Immunreaktion während einer Tuberkuloseinfektion zu haben (Rhodes et al., 2000). Es wurde herausgefunden, dass in mit *M. bovis* infizierten Rindern mit einer relativen Verzögerung zur Produktion von IFN- $\gamma$  ein IL-4 Peak eintritt. Die Autoren vermuteten, dass IL-4 die proinflammatorische Wirkung des IFN- $\gamma$  und damit die Ausbildung von Läsionen eindämmt. Ähnliches gilt wohl auch für IL-10, dessen Level nach einer Infektion mit *M. bovis* parallel zur IFN- $\gamma$  Produktion ansteigt und so vermutlich den Schaden im Gewebe eingrenzen soll (Witchell et al., 2010).

### **2.3.1.2 Antikörper**

Auch Antikörper sind an der Immunreaktion im Laufe dieser Infektionskrankheit beteiligt. T-Lymphozyten treten bei Infektionen als zwei verschiedene Typen auf: Th1-Zellen und Th2-Zellen. Sie reagieren in unterschiedlicher Weise auf den Krankheitserreger (Romagnani, 1996). Während früher Infektionsstadien mit Mykobakterien dominiert die zelluläre Immunantwort durch Th1-Lymphozyten und IFN- $\gamma$ . Im späteren Verlauf, wenn die Krankheit weiter voranschreitet, kann es zu einer Verschiebung in Richtung einer Th2-Antwort mit einer Anergie der zellulären Immunantwort und vermehrtem Auftreten von Antikörpern (IgG1) kommen (Boussiotis et al., 2000; Dlugovitzky et al., 2000; Ritacco et al., 1991). In der Anergiephase haben infizierte Tiere keine durch den Tuberkulintest nachweisbare zelluläre Immunantwort mehr, jedoch können Antikörper nachgewiesen werden (Neill et al., 1994; Plackett et al., 1989). Mykobakterien, die durch Antikörper markiert wurden, scheinen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten besser aufgenommen und abgetötet zu werden (de Valliere et al., 2005). Trotzdem wurde in einer Studie von Welsh und Mitarbeitern gezeigt, dass das Auftreten von Antikörpern bei Rindern häufig mit ausgeprägten Veränderungen und einer weiteren Ausbreitung der Krankheit im Körper einhergeht (Welsh et al., 2005).

### **2.3.2 Zelluläre Immunantwort**

Es ist allgemein bekannt, dass bei einer Tuberkuloseinfektion die zellvermittelte Immunantwort die wichtigere Reaktion ist (Neill et al., 1994). Die daran beteiligten Zellen sind T-Lymphozyten, sowie die im Zellbild vorherrschenden Makrophagen, Epitheloidzellen und mehrkernigen Riesenzellen (Ackermann, 2009). Auch neutrophile Granulozyten treten auf (Palmer et al., 2007).

#### **2.3.2.1 T-Lymphozyten**

An der Immunabwehr gegen Tuberkulose sind verschiedene Typen von T-Lymphozyten beteiligt. Zu den wichtigsten gehören die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, T-Lymphozyten, die den  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor tragen ( $\alpha\beta$ TcR<sup>+</sup>-Zellen),  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor-

Zellen ( $\gamma\delta\text{TcR}^+$ -Zellen) und NKT-Zellen (Pollock et al., 2001; Schluger & Rom, 1998; Torrado et al., 2011).

$\text{CD4}^+$ -Zellen erkennen Antigene, die innerhalb des Phagosoms verarbeitet wurden und dann als kleine Peptidfragmente an den *major histocompatibility complex* (MHC) II gebunden werden. Durch dieses Molekül werden sie auf der Oberfläche von dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten präsentiert. Die Hauptaufgabe von  $\text{CD4}^+$ -Zellen liegt darin, Effektorzellen (Makrophagen,  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen und NK-Zellen) zu aktivieren (Schluger & Rom, 1998). Die Differenzierung zu diesen Phänotypen aus den Vorläuferzellen wird durch Zytokine wie IL-12 angeregt. Th1-Zellen produzieren vor allem  $\text{IFN-}\gamma$ , welches zur Aktivierung der Makrophagen nötig ist, und IL-2, das unter anderem die Proliferation von Th1-Zellen fördert (Sakamoto, 2012). Auf die Zytokinproduktion der Th2-Zellen und deren Wirkungsweise wurde oben (s. „Zytokine“) bereits eingegangen.

$\text{CD8}^+$ -Zellen reagieren auf Antigene, die an MHC I-Moleküle gebunden sind. Diese Antigene entstehen im Zytosol der Zelle selbst, werden aufbereitet und dann, an das MHC I-Molekül gebunden, an die Oberfläche transportiert und dort nahezu allen kernhaltigen Zellen im Körper präsentiert. Neben der Produktion von Zytokinen wie  $\text{IFN-}\gamma$  und IL-4 sind die  $\text{CD8}^+$ -Zellen vor allem auch an der Lyse und Einleitung der Apoptose infizierter Zellen direkt beteiligt (Schluger & Rom, 1998). In einer Untersuchung (Stenger et al., 1997) konnte gezeigt werden, dass die  $\text{CD8}^+$ -Zellen Makrophagen, die mit *M. tuberculosis* infiziert sind, durch Exozytose von Perforin und Granzym enthaltenden Granula, lysieren und dieser Vorgang auch in der Abtötung des Erregers endet.

$\gamma\delta\text{TcR}^+$ -Zellen gehören zu den eher unkonventionellen T-Zell-Populationen. Während der Infektion mit Mykobakterien produzieren sie IL-17 und  $\text{IFN-}\gamma$ . IL-17 ist ein Zytokin, das für die frühe Phase der Granulombildung eine wichtige Rolle spielt (Torrado et al., 2011). Ansonsten fungieren sie weitestgehend als zytotoxische T-Zellen (Schluger & Rom, 1998). Sie kommen bei Wiederkäuern in deutlich höherer Anzahl als bei Menschen und Mäusen vor (Hein & Mackay, 1991).

Ein ebenfalls bei der Tuberkulose, vor allem des Menschen, vorkommender T-Lymphozytentyp sind die CD1-restringierten  $\alpha\beta\text{TcR}^+$ -Zellen. Sie exprimieren in der Regel weder CD4- noch CD8-Rezeptoren. Der CD1-Rezeptor ist ein MHC-ähnliches Molekül an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen. Im Gegensatz zum MHC ist

er jedoch in der Lage, Lipide zu binden, im Fall von *M. tuberculosis* Mykolsäuren oder PIMs. Diese Zellen sezernieren ebenfalls IFN- $\gamma$ , töten infizierte Makrophagen ab und unterstützen Makrophagen dabei, intrazellulär liegende Mykobakterien unter ihre Kontrolle zu bringen (Boom et al., 2003).

#### **2.3.2.2 Neutrophile Granulozyten**

Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten finden sich vor allem in frühen Entwicklungsstadien der Granulome (Palmer et al., 2007). Eine positive Korrelation zwischen ihrer Anzahl und der Anzahl von Mykobakterien lässt vermuten, dass sie durch eine erhöhte Bakterienlast angelockt werden (Menin et al., 2013). Am Infektionsort phagozytieren sie den Erreger, wodurch verschiedene Reaktionsmechanismen induziert werden. Am neutrophilen Granulozyten selbst ändert sich das Muster der Oberflächenmoleküle (vor allem Rezeptoren), es werden vermehrt TNF- $\alpha$  und IL-10 sezerniert, der *respiratory burst* wird gesteigert und Autophagie induziert. Außerdem sind sie in der Lage durch die Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine Monozyten zu aktivieren und sie aus dem Blut anzulocken. Jedoch ist *M. bovis* in der Lage in ihnen zu überleben, was letztendlich zu ihrem Untergang führt. Es ist nach wie vor umstritten, ob neutrophile Granulozyten von ihnen aufgenommene Mykobakterien *in vivo* tatsächlich töten können (Wang et al., 2013).

#### **2.3.2.3 Makrophagen**

Wie im Kapitel „Übertragung und Erregerausscheidung“ bereits erwähnt, ist der Haupteintrittsort des Tuberkuloserregers der Respirationstrakt. Tröpfchen von einer Größe von bis zu 5 $\mu$ m, die wenige Mykobakterien enthalten, können direkt in die Alveolen gelangen (Langmuir, 1961). Dort werden sie von Alveolarmakrophagen aufgenommen und von diesen entweder zerstört, sodass keine Tuberkulose entsteht, oder sie vermehren sich darin, bis diese zugrunde gehen. Durch die Freisetzung der Bakterien und die Beteiligung von Zytokinen werden Monozyten aus dem Blut angelockt, die dann als Makrophagen die Erreger durch Phagozytose aufnehmen. Da diese jedoch noch nicht aktiviert sind, können sie die Mykobakterien nicht eliminieren (Dannenbergh, 1991). Erst nachdem T-Zellen das an den sogenannten *major*

*histocompatibility complex* (MHC) gebundene mykobakterielle Antigen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen erkannt haben, setzen sie Zytokine frei (s.o. bei „Zytokine“), die die Makrophagen aktivieren (Neill et al., 1994). Diese sind dann in der Lage durch verschiedene Mechanismen, unter anderem durch die Phagosom-Lysosom Verschmelzung und das Herstellen von reaktiven Sauerstoff- und reaktiven Stickstoffverbindungen, die pathogenen Bakterien abzutöten (Schluger & Rom, 1998). Außerdem konnte, zumindest *in vitro*, in einer Untersuchung gezeigt werden, dass durch die Interaktion von Makrophagen und aktivierten T-Zellen *M. bovis* aus chronisch infizierten Makrophagen freigesetzt werden, sodass diese dann von anderen Makrophagen mit besseren mykobakteriziden Eigenschaften aufgenommen werden können (Liebana et al., 2000). In tuberkulösen Granulomen erscheinen aktivierte Makrophagen vor allem in der Epitheloidzellform. Außerdem können sie miteinander verschmelzen, sodass sie zu sogenannten mehrkernigen Riesenzellen vom LANGHANS-Typ werden (Puissegur et al., 2004). Diese Fusion wird durch proinflammatorische Glykolipide (u.a. Lipomannan) der Mykobakterienzellwand induziert (Puissegur et al., 2007). Eine negative Korrelation zwischen der Anzahl mehrkerniger Riesenzellen und der Anzahl an Mykobakterien lässt darauf schließen, dass sie ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur Kontrolle der Erkrankung leisten (Menin et al., 2013).

## 2.4 Pathogenese

Die Entstehung und Entwicklung der Tuberkulose bei Tieren ist sehr detailliert von Nieberle (Nieberle, 1938) und sehr ähnlich auch von Pallaske (Pallaske, 1961) beschrieben worden. Beide Autoren unterscheiden zwischen entzündlich exsudativen Prozessen mit Kapillarhyperämie, Exsudation von Fibrin und Leukozyten mit anschließender Quellung und Verkäsung und entzündlich produktiven Prozessen, bei denen die Wucherung von Epitheloid- und LANGHANSschen Riesenzellen im Vordergrund steht. In diesen Wucherungen kommt es dann zur zentralen Verkäsung mit Verkalkung, peripher treten Lymphozytenansammlungen auf und es finden Abkapselungsvorgänge durch fibröses Bindegewebe statt. Primär produktive Prozesse führen demnach eher zur Ausbildung des typischen Tuberkels, während sich exsudativ



entzündliche Prozesse vor allem in diffus und akut verkäsenden Tuberkuloseformen finden lassen (Pallaske, 1961).

Es erfolgt bei beiden Autoren eine Einteilung – in Anlehnung an eine Einteilung bei der Tuberkulose des Menschen – in zwei Perioden, die Primärinfektionsperiode (bei Nieberle Erstinfektionsperiode) und die Superinfektionsperiode (bei Nieberle Reinfektionsperiode).

Die Primärinfektionsperiode beginnt mit dem Eindringen der Bakterien in den Organismus, wobei sie an ihrer Eintrittsstelle einen „Affekt“, nach Pallaske den sogenannten Primäraffekt, hinterlassen. Als Haupteintrittsorgan wird bei beiden Autoren die Lunge genannt, aber auch Darm und Leber werden erwähnt. Auch im zugehörigen Lymphknoten erfolgt eine tuberkulöse Gewebsreaktion, womit der sogenannte Primärkomplex gebildet ist (Primäraffekt im Organ und Reaktion im Lymphknoten). In diesem Primärkomplex können die entzündlichen Vorgänge zum Erliegen kommen, die Herde werden abgekapselt und verheilen, oder aber es kommt, vor allem durch lymphohämatogene Ausbreitung, zur Frühgeneralisation (Nieberle, 1938). Auch eine rein lymphogene, hämatogene oder intrakanalikuläre Ausbreitung ist möglich. Durch eine lymphohämatogene Streuung entstehen metastatische Herdveränderungen vorwiegend in der Lunge, der Leber, den Nieren, der Milz und auch im Knochenmark (Nieberle, 1938). Dabei kann entweder das Erscheinungsbild einer akuten Miliartuberkulose mit gleichaltrigen miliaren Herden entstehen, oder die Generalisation erfolgt protrahiert mit unterschiedlich alten und großen Herden. Nieberle und Pallaske stellen beide deutlich heraus, dass bei diesen Generalisationsformen die zu den betroffenen Organen gehörigen Lymphknoten gleichermaßen miterkranken und die entstehenden Herde in Aufbau und Struktur dem Primärkomplex sehr ähneln. Der tuberkulöse Prozess kann auch nach der Generalisation in der Primärinfektionsperiode zur Ruhe kommen, sodass die betroffenen Rinder nicht mehr krank erscheinen (Pallaske, 1961).

Kommt es erneut zu einer Infektion des Organismus, endogenen (aus bereits vorhandenen Herden) oder exogenen Ursprungs, tritt die Superinfektionsperiode (nach Pallaske) ein. Im Zuge dieser kann es nach Nieberle auch beim Rind zum Auftreten der isolierten chronischen Organtuberkulose kommen, wobei vor allem Lunge und Euter betroffen sind (Pallaske, 1961). Die isolierte chronische Organtuberkulose zeichnet sich bei beiden Autoren zufolge dadurch aus, dass sie mit deutlichem zeitlichem Abstand zur Primärinfektionsperiode auftritt, nur das eine Organ betroffen ist, nicht aber die

zugehörigen Lymphknoten, der tuberkulöse Prozess breitet sich nur innerhalb des Organs auf kanalikulärem Weg langsam aus und die lympho- und hämatogene Streuung tritt zurück. Die Resistenzlage des Tieres ist dabei recht gut. Vermindert sich diese jedoch durch Stressfaktoren wie Geburten, übermäßige Leistungen, Mängel in der Haltung, Transporte oder Krankheiten, tritt die Niederbruchsphase ein. Sie kann sich in einem „Ableiten“ schon vorhandener chronischer Organtuberkulosen oder auch als rasch um sich greifende Prozesse ohne vorherige Organveränderungen darstellen, wobei in dieser Phase auch die Lymphknoten wieder mitbetroffen sind (Pallaske, 1961). Nieberle betont hierbei die akute multipel lobulär-verkäsende Pneumonie und die galoppierende azinöse Lungentuberkulose. Außerdem kann es nach beiden Autoren durch ein vermehrtes Auftreten der Bakterien im Blut ebenfalls zu einer akuten Miliartuberkulose kommen. Sowohl die schnell voranschreitenden Organveränderungen, als auch die akute Miliartuberkulose werden von beiden als Spätgeneralisation bezeichnet.

## **2.5 Klinik**

Das klinische Erscheinungsbild der Tuberkulose des Rindes stellt sich je nach Phase und betroffenem Organ unterschiedlich dar. Meistens treten Symptome erst auf, wenn es zur Frühgeneralisation, chronischer Organtuberkulose oder Spätgeneralisation gekommen ist. Eine Generalisation zeigt sich vor allem durch Fieber, reduziertes Allgemeinbefinden, Fressunlust, Anämie und Abmagerung. Weitere Symptome richten sich nach dem betroffenen Organ (Trautwein, 2006).

In Studien von Neill und Mitarbeitern (Neill et al., 1988a; Neill et al., 1989) zeigten experimentell infizierte Kälber sowie eines, das mit diesen Kontakt hatte, eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit Abmagerung, Dyspnoe, geräuschvoller Expiration durch geschwollene Retropharyngeallymphknoten sowie Schnarchen.

Von den betroffenen Organen werden wegen der möglichen Übertragung vor allem Lunge, Darm, Gebärmutter und Hoden die größte Bedeutung zugesprochen (Valentin-Weigand, 2011).

Eine Lungentuberkulose äußert sich durch Husten, zum Teil mit schleimigem Auswurf, angestrenzter Atmung sowie Rasselgeräuschen bei der Auskultation (Frerking et al.,

1995; Trautwein, 2006). Ein Krugatmen deutet auf Kavernenbildung hin (Trautwein, 2006).

Ist der Verdauungstrakt betroffen, treten eventuell graugelbe Knötchen auf der Schleimhaut von Maul und Rachen auf. Infektionen des Darms sind oft klinisch unauffällig, jedoch kann es auch zu Durchfall, Kotverhaltung oder Kolik kommen. Uterus und Infundibulum werden auf lympho-hämatogenem Wege befallen. Es können eitriger Scheidenausfluss, Anöstrie sowie Aborte auftreten. Bei der Eutertuberkulose können drei verschiedene Formen unterschieden werden. Sie entsteht auf hämatogenem, seltener auf galaktogenem Weg. Bei einer miliartuberkulösen Mastitis sind die Euterlymphknoten vergrößert und es sind miliare Knötchen innerhalb des Parenchyms tastbar, die Milch zeigt kaum Abweichungen. Bei der chronischen lobulär-infiltrierenden Eutertuberkulose sind größere Abschnitte des Euters betroffen und das Sekret zunehmend verändert (wässrig, graugelb und flockig), jedoch, im Unterschied zur Mastitis caseosa, ist das Gewebe weder vermehrt warm noch druckempfindlich. Die Mastitis caseosa äußert sich nämlich als akute Entzündung mit Wärme, Schmerzhaftigkeit, Schwellung und Ödematisierung der Unterhaut; die Lymphknoten sind ebenfalls verändert. Beim männlichen Tier können Knoten in Hoden und Nebenhoden auftreten. In selteneren Fällen können das ZNS in Form einer tuberkulösen Leptomeningitis, sowie Knochen und Augen betroffen sein (Trautwein, 2006).

## **2.6 Diagnose**

### **2.6.1 Tuberkulintest**

Als Tuberkulin wird ein gereinigtes Proteinderivat (engl. purified protein derivative, PPD) verwendet (OIE, 2009). In Deutschland erfolgt die Tuberkulinprobe im Verdachtsfall mittels Simultan- oder Monotest (Tuberkulose-VO). Anforderungen an das zu verwendende Tuberkulin sowie Anweisungen zur Durchführung des Testes sind in der „Richtlinie des Rates zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen“ (64/432/EWG) im Anhang B, geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1226/2002, festgelegt. Danach werden sowohl der Monotest (nur Rindertuberkulin) als auch der Simultantest (Rinder-

und Geflügeltuberkulin) offiziell als Intrakutanprobe anerkannt. Eine Injektionsdosis sollte mindestens 2000 IE des jeweiligen Tuberkulins enthalten und darf maximal 0,2 ml umfassen. Die Injektionsstelle liegt für den Monotest am Übergang vom ersten zum mittleren Nackendrittel. Beim Simultantest liegt die Stelle für das Geflügeltuberkulin 10 cm vor oder hinter der Schulterblattgräte und die für das Rindertuberkulin 12,5 cm tiefer. Zunächst ist der Hautbereich zu scheren und zu säubern. Danach wird eine Hautfalte aufgezogen, gemessen und die Dicke notiert. Dann wird die Tuberkulindosis injiziert und das Ergebnis nach 72 Stunden abgelesen. Beim Monotest ist das Ergebnis negativ, wenn eine Schwellung von weniger als 2 mm vorliegt und keine klinischen Symptome wie Ödeme, Exsudation, Schmerzempfindlichkeit oder Entzündung der regionalen Lymphgefäße oder Lymphknoten auftreten. Um ein zweifelhaftes Ergebnis handelt es sich, wenn eine Schwellung von mehr als 2 mm und weniger als 4 mm ohne klinische Symptome auftritt. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn klinische Zeichen auftreten oder eine Hautdickenzunahme von 4 mm und mehr eintritt. Beim Simultantest, dessen Ziel es ist, zwischen einer Tuberkuloseinfektion und einer Infektion mit anderen Mykobakterien zu unterscheiden, liegt ein positives Ergebnis vor, wenn die Hautdickenzunahme an der bovinen Stelle mehr als 4 mm als die an der aviären Stelle beträgt. Das Ergebnis ist zweifelhaft, wenn die Hautdickenzunahme nur 1-4 mm gegenüber der aviären Stelle beträgt. Wenn die Hautdickenzunahme an der bovinen Stelle weniger oder gleich der an der aviären Stelle ist, handelt es sich um ein negatives Ergebnis.

Bei einer anderen Variante des Intrakutan-Monotest erfolgt die Injektion in die Schwanzfalte. Die Injektionsstelle befindet sich mittig zwischen dem ventralen Teil der Schwanzfalte und der Haarlinie oberhalb der Wirbel. Nach der Standardinterpretation des Monotests an der Schwanzfalte gilt jegliche Hautdickenzunahme als Reaktion (OIE, 2009).

Der Tuberkulintest ist durch andere Faktoren beeinflussbar. So konnte in Versuchen von Claridge und Mitarbeitern eine negative Korrelation zwischen dem Auftreten einer Infektion mit dem Leberegel *Fasciola hepatica* und der Effektivität des Simultantests demonstriert werden. Dabei zeigten Tiere, die nur mit *M. bovis* infiziert waren eine stärkere Reaktion auf den Test, als Tiere, die zusätzlich noch mit *F. hepatica* infiziert waren (Claridge et al., 2012).

### **2.6.2 $\gamma$ -Interferontest**

Für den  $\gamma$ -Interferontest wird den zu untersuchenden Tieren zunächst Blut abgenommen (heparinisiert). Dieses wird dann mit dem entsprechenden Antigen, also bovinem oder aviärem PPD (oder beidem), für 24 Stunden kultiviert. Danach wird der Kulturüberstand, das Plasma, isoliert und mittels eines Sandwich-Enzyme Immunoassay (EIA) der Gehalt an Interferon- $\gamma$  ermittelt. Dieses wird von spezifisch sensibilisierten T-Lymphozyten bei Kontakt mit *M. bovis*-Antigen freigesetzt. Das Ergebnis liegt innerhalb von 24 - 48 Stunden vor (Rothel et al., 1990). Nach Angaben einer Feldstudie in australischen Rinderherden, die den  $\gamma$ -Interferontest mit dem Tuberkulinmonotest in der Schwanzfalte vergleicht, wurde eine Spezifität von 96,2 – 98,1 % und eine Sensitivität von 76,8 – 93,6 % evaluiert. Die Sensitivität wurde durch die Kombination beider Tests auf 95,2 % gesteigert (Wood et al., 1991). Bis zu sieben Tagen nach einem durchgeführten Hauttest kann der Interferon- $\gamma$ -Wert reduziert sein, gefolgt von einer Phase der verstärkten Antwort (Rothel et al., 1992). In einem weiteren Versuch wurde im  $\gamma$ -Interferontest eine hohe Sensitivität und Spezifität erreicht, acht bis 28 Tage nachdem ein Tuberkulintest durchgeführt wurde (Ryan et al., 2000). Der Vorteil gegenüber dem Hauttest liegt darin, dass durch den  $\gamma$ -Interferontest der Immunstatus der Tiere nicht beeinträchtigt wird, sodass er beliebig wiederholt werden kann (Wood et al., 1992). In Deutschland kann der Test ergänzend zum Tuberkulintest durchgeführt werden (Tuberkulose-VO).

### **2.6.3 ELISA zum Nachweis von Antikörpern**

Die Verwendung eines enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zur Diagnose von boviner Tuberkulose mittels Nachweis von Antikörpern im Blut ist zum ersten Mal 1984 beschrieben worden (Thoen et al., 1984). Der ELISA erzielte zwar in einigen Versuchen eine gute Spezifität (z.B. bei Silva 94,4 %), jedoch nur eine recht niedrige Sensitivität mit Werten von 47 % und 49,5 % (Silva, 2001; Wood & Rothel, 1994), wobei in den Untersuchungen Woods und Rothels ein ELISA gegen MPB70, ein spezifisches sekretorisches Protein (s. Abschnitt PCR), verwendet wurde, während Silva den Überstand einer im Ultraschallbad behandelten *M. bovis* AN5-Kultur und damit ein breiteres Spektrum von Antigenen benutzte. Eine höhere Sensitivität kann erzielt

werden, wenn die Tiere vor Anwendung des ELISA tuberkulinisiert werden. Von diesem Effekt haben auch bereits andere Autoren berichtet (Lepper et al., 1973; Wood & Rothel, 1994). So ergab sich in den Versuchen von Casal und Mitarbeitern 15 Tage nach der Durchführung des Tuberkulintests für den ELISA eine Sensitivität von 70,4 % (für den *M. bovis* Ab Test ELISA) und 85,2 % (für das Enferplex AB assay) in Herde A und 66,7 % und 83,3 % in Herde B (Casal et al., 2014). Wie unter 2.3.1.2 bereits erwähnt, treten Antikörper vermehrt im fortgeschrittenen Krankheitsprozess auf, womit der ELISA potentiell eine gewisse Auskunft über den Schweregrad einer Infektion liefern könnte und hilfreich wäre, Prioritäten in der Herdensanierung zu setzen (Silva, 2001). Außerdem ist dieser Test, im Gegensatz zum Tuberkulintest, in der Lage, auch Tiere in der Anergiephase zu identifizieren (Silva, 2001). In einem Versuch, in dem ein ELISA mit dem Simultan- und dem  $\gamma$ -Interferontest verglichen wurde, konnten mittels des ELISA zwei von zehn Tieren, die mit den anderen beiden Tests ein negatives Ergebnis erzielten, als infiziert erkannt werden. Diese Tiere wiesen in der pathologischen Untersuchung tuberkulöse Läsionen auf (Waters et al., 2011). Die in diesem Kapitel (II.6.2) genannten Autoren halten den ELISA für ein geeignetes ergänzendes diagnostisches Verfahren zum Tuberkulintest oder  $\gamma$ -Interferontest, jedoch sehen sie ihn wegen seiner geringen Sensitivität nicht als möglichen Ersatz dieser Tests an.

#### **2.6.4 Bakteriologische Untersuchung**

Zur Kultivierung von Mykobakterien sind drei verschiedene Typen von Medien geeignet: feste Nährböden auf Ei-Basis, wie z.B. Stonebrink oder Löwenstein-Jensen, feste Nährmedien auf Basis von Agar, wie Middlebrock 7H10 und 7H11 oder Tuberkulose-Blutagar (B83), sowie Flüssigmedien wie Middlebrock 7H9 (Gormley et al., 2014). Innerhalb von sieben Tagen zeigen sich die schnell wachsenden Vertreter, während hingegen die langsam wachsenden Mykobakterien, wie Angehörige des *M. tuberculosis*-Komplex, mehr als sieben Tage benötigen (Valentin-Weigand, 2011). Kulturen in Flüssigmedien, in diesem Fall in BACTEC 12B und MGIT 960, können bereits innerhalb von zwei bis drei Wochen als positiv erkannt werden, sie sind jedoch auch anfälliger für eine Kontamination als feste Medien (Robbe-Austerman et al., 2013). In einer vergleichenden Untersuchung zum Wachstum von Kulturen von

*M. tuberculosis* aus humanem Sputum auf einem Dünnschicht-Agarmedium und dem Löwenstein-Jensen-Medium, wurden 75 % der positiven Proben auf dem Dünnschicht-Agarmedium innerhalb von 19 Tagen identifiziert im Vergleich zu 52 Tagen auf dem Löwenstein-Jensen-Medium (Battaglioli et al., 2013). Des Weiteren erwies sich das verwendete Dünnschicht-Agarmedium als sensitiver (Sensitivität 0,86) als das Löwenstein-Jensen-Medium (Sensitivität 0,76). Im Nachteil ist der Nachweis mittels Kultur gegenüber der PCR, da diese auch DNA aus toten Bakterien nachweist, während hingegen für Kulturen vitale Zellen erforderlich sind (Adams et al., 2013). Ein neueres Kulturmedium auf Gel-Basis bettet die Bakterien in einem Fasergerüst ein und erwies sich in ersten Versuchen ebenfalls als relativ schnelle (7 - 14 Tage) und effiziente Methode (Jang et al., 2014).

### 2.6.5 PCR

Als weiteres diagnostisches Verfahren ist in der Tuberkulose-VO die PCR erwähnt, welche auch zur weiteren Diagnostik nach einer Anzüchtung auf selektiven Nährmedien durchgeführt werden kann (Zarden et al., 2013). Die Methode beruht auf der Amplifizierung einer bestimmten DNA-Sequenz durch Einsatz von Primern und einer Polymerase mit nachfolgendem Nachweis dieser Sequenz durch eine Agarosegelelektrophorese. In Deutschland wird zur Bestimmung des *M. tuberculosis*-Komplex eine real time PCR durchgeführt. Als Zielsequenzen werden dabei das Gen einer hypothetischen Helicase und das Insertionselement 1081 verwendet. Um letztendlich *M. caprae* identifizieren zu können, wird eine nach Reddington et al. (2011) modifizierte real time PCR angewandt (Friedrich-Loeffler-Institut, 2015).

Ein weiterer Nachweis des *M. tuberculosis*-Komplex kann über die Identifikation einer 372 Basenpaare langen Sequenz eines Gens erfolgen, welches für die Produktion des MPB70 sekretorischen Proteins verantwortlich ist (Cousins et al., 1991). Von diesem Protein wird angenommen, dass es spezifisch für *M. bovis* ist (Wood et al., 1988). Zu einer genaueren Differenzierung der Mykobakterienspezies ist der Einsatz mehrerer unterschiedlicher Primerpaare erforderlich (Huard et al., 2003). In den Versuchen von Cousins und Mitarbeitern (1991) wurde die PCR-Methode an Mykobakterien aus Kulturen angewendet. Die Autoren beschreiben ihre Methode als spezifisch und sehr

sensitiv. Als weiterer Vorteil wird genannt, dass das Ergebnis sehr schnell vorliegt (noch am Tag, an dem auch das Wachstum in den Kulturen festgestellt wird). Wird eine PCR zum Nachweis von Mykobakterien-DNA in Gewebeproben angewandt, sind weitere Faktoren zu beachten. Es kann schwierig sein, den fakultativ intrazellulären Erreger aus Zellen zu extrahieren, oder es können Bestandteile im Gewebe vorhanden sein, die die Reaktion beeinträchtigen (Wards et al., 1995). Nach der amtlichen Methodensammlung des FLI (2015) können zur DNA-Extraktion aus Gewebeproben das DNeasy Blood and Tissue Kit oder das High Pure PCR Template Preparation Kit verwendet werden.

## **2.6.6 Pathologie**

### **2.6.6.1 Makroskopie**

Die klassische Läsion der Tuberkulose ist der Tuberkel. Er stellt sich als ein hellgelber bis weißer, umschriebener, oft eingekapselter, 1-40 mm großer Herd dar. Häufig treten darin verkäsende Nekrose und Verkalkung auf. In größeren Läsionen kann es zur Verflüssigung des Gewebematerials kommen, wodurch eine Ähnlichkeit zu Abszessen besteht. Tuberkulöse Veränderungen finden sich häufig in den Retropharyngeal-, Bronchial- und Mediastinallymphknoten sowie in der Lunge bei Infektionen des Atmungstraktes, selten in Mandibular- und Parotistrymphknoten sowie in den Tonsillen (Maxie et al., 2007). Außerdem können im Darm, in der Leber, der Niere, der Milz, im Genitaltrakt, Euter, Knochen, Brustfell, Bauchfell, im Herzbeutel und in den Hirnhäuten sowie in den weiteren Lymphknoten des Körpers Läsionen auftreten (Maxie et al., 2007; Nieberle, 1938; Pallaske, 1961). In vielen Ländern werden die meisten infizierten Tiere, vermutlich aufgrund von erfolgreich durchgeführten Bekämpfungsprogrammen, bereits in Anfangsstadien der Erkrankung identifiziert, wodurch spätere Erkrankungsstadien nur noch selten vorkommen (Domingo et al., 2014).

#### **2.6.6.1.1 Lunge**

Detaillierte Beschreibungen unterschiedlicher makroskopischer Läsionen in der Lunge finden sich bei Stamp (1948). Seinen Untersuchungen lag Material von 100 Tieren aus einem Schlachthof in Edinburgh zugrunde. Zur Vorgeschichte dieser Tiere war nichts



bekannt. Er teilte die Läsionen folgendermaßen ein: eingekapselte verkäste Knoten mit Verkalkung, 1 cm oder weniger im Durchmesser, eingekapselte verkäste Knoten mit Verkalkung von 1 - 2 cm Durchmesser, frühe und noch aktive Läsionen, mehr oder minder eingekapselt, große eingekapselte verkäste und verkalkte Läsionen, akut verkäsende Pneumonie mit Kavernenbildung, fibrotische Kavernenbildung, koaleszierende verkäsende azinöse Bronchopneumonie und noduläre Bronchopneumonie. Die knotigen Veränderungen stellten sich als Herde mit Nekrose und Verkalkung, umgeben von einer Bindegewebskapsel, dar. Frühe Läsionen erschienen als konsolidierte Lungenbereiche mit zum Teil wenig zentraler Verkäsung und variabler Größe. Bei der akut verkäsenden Pneumonie fanden sich massive Nekrose und Kavernenbildung. Der Unterschied zwischen der koaleszierenden verkäsenden azinösen Bronchopneumonie und der nodulären Bronchopneumonie besteht darin, dass sich bei der ersten Form mehrere Herde verbinden und von einer gemeinsamen Kapsel eingefasst werden, während bei der zweiten Form mehrere benachbarte Lungenläppchen verkäsen und einzeln eingekapselt werden. In allen Fällen waren die dazugehörigen Lymphknoten mitverändert. Der Autor geht davon aus, dass es sich bei den beschriebenen Läsionen um Primärkomplexe handelt (Stamp, 1948). Weitere Formen der Lungentuberkulose finden sich in den Beschreibungen von Nieberle, und zwar die chronische Lungentuberkulose, die multipel lobulär-verkäsende Pneumonie sowie die galoppierende azinöse Lungentuberkulose. Bei der chronischen Lungentuberkulose sind einzelne Läppchen oder Läppchengruppen betroffen; das Gewebe ist kompakt und weist eine blaurote Farbe auf; die Schnittfläche ist glatt und feucht und es zeigen sich hirsekorn- bis linsengroße Knötchen, die im Zentrum erweicht und mit gelblichem Material gefüllt sind. Die Wände der inter- und intralobulären Bronchien sind verdickt und im Lumen liegen eitrig-käsige Massen. Diese Veränderungen können weiter fortschreiten bis hin zu Kavernenbildung. Die regionären Lymphknoten sind nicht mitbetroffen. Eine multipel lobulär-verkäsende Pneumonie tritt in Form von verkästen Herden innerhalb eines Läppchens auf oder umfasst ein ganzes Läppchen. Die Schnittfläche ist trüb mit gelblich-käsiger Farbe und feinen Blutpunkten. Weitere miliare Knötchen können als Hinweis auf die akute Generalisation auftreten. Die regionären Lymphknoten sind hochgradig geschwollen und ödematisiert oder verkäst mit Blutpunkten. Bei der galoppierenden azinösen Lungentuberkulose findet sich makroskopisch ein ähnliches Bild wie bei der chronischen Lungentuberkulose, jedoch

größere Teile der Lunge betreffend (Nieberle, 1938).

#### **2.6.6.1.2 Euter**

Nieberle unterscheidet drei Formen der Eutertuberkulose: die Miliartuberkulose, die chronische Eutertuberkulose und die Mastitis caseosa. Die Miliartuberkulose entsteht durch Generalisation und zeichnet sich durch das Auftreten miliärer Knötchen mit zentraler Verkäsung und Verkalkung unter Miterkrankung der regionären Lymphknoten aus. Ein von chronischer Organtuberkulose befallenes Euter ist erkennbar anhand von einer Volumenzunahme, kompakter Konsistenz, einer trockenen und deutlich gefelderten Schnittfläche mit graurötlicher Farbe sowie der Abwesenheit tuberkulöser Veränderungen der regionären Lymphknoten. Bei der Mastitis caseosa, die aus der chronischen Eutertuberkulose hervorgeht, stehen entzündlich exsudative Prozesse im Vordergrund, wobei landkartenähnliche, gelbe und trockene Verkäsungsfelder, umgeben von einem roten Hof, entstehen (Nieberle, 1938).

#### **2.6.6.1.3 Geschlechtsorgane**

Die Tuberkulose der weiblichen Geschlechtsorgane kann primär an den äußeren Geschlechtsorganen durch den Begattungsakt (wenn die Geschlechtsorgane des männlichen Tieres tuberkulöse Veränderungen aufweisen), an den inneren durch hämatogene Streuung oder als Folge einer Bauchfellentzündung entstehen. An der Gebärmutter kann es auf hämatogenem Wege zur Entstehung submuköser Knötchen in der Wand kommen, die auch ulzerieren können (Januschke, 1928). Bei einer ausgebreiteten Gebärmuttertuberkulose sind die Wände insgesamt knollig verdickt und auf der Schleimhaut zeigen sich grauweiße Knötchen. Beim Aufbrechen dieser Knötchen entstehen Geschwüre (Januschke, 1928). Von den männlichen Geschlechtsorganen sind am häufigsten die Hoden und Nebenhoden betroffen. Sie erkranken auf hämatogenem Wege. Als Veränderungen treten verkäste und verkalkte Tuberkel auf, außerdem kann der Nebenhoden durch mehr diffuse Verkäsung insgesamt verdickt erscheinen. An Penis und Präputium, die häufig primär erkranken, können sich ebenfalls Knötchen und Knötchenkonglomerate befinden (Pallaske, 1961).

#### **2.6.6.1.4 Darm**

Primärkomplexe sind hier meistens unvollständig. In der Regel finden sich Tuberkel oder auch eher flächenhafte Verkäsung mit Verkalkung in den mehr oder weniger geschwollenen Mesenteriallymphknoten. Neben der Möglichkeit der primären Infektion des Darms können auch durch abgeschlucktes Sputum, vor allem in den PEYERschen Platten, Läsionen im Darm und Mesenteriallymphknoten entstehen (Pallaske, 1961).

#### **2.6.6.1.5 Leber**

Die Leber kann kongenital oder in Form einer isolierten chronischen Organtuberkulose nach Generalisation erkranken. Bei der kongenitalen Form sind vor allem die Portallymphknoten betroffen, aber auch in der Leber können einzelne Herde gefunden werden. Die Lymphknoten zeigen eine geringe bis deutliche Schwellung mit verkästen und verkalkten Herden oder strahlig das Gewebe infiltrierender Verkäsung. Bei der chronischen Lebertuberkulose finden sich große Knoten, die eiterähnlich einschmelzen können (Pallaske, 1961).

#### **2.6.6.1.6 Niere, Milz, Knochen, Hirn und Meningen**

Diese Gewebe werden im Zuge einer Generalisation befallen, sodass metastatische Herde entstehen. In der Niederbruchphase kann eine akut-verkäsende Leptomeningitis, die häufig auch auf das Hirn übergreift und somit eine Meningoencephalitis entsteht, auftreten. Im Hirnparenchym können einzelne, bis zu walnussgroße verkäste und verkalkte Knoten auftreten, während an der Leptomeninx häufig das Bild einer akuten Miliartuberkulose mit multiplen miliaren Tuberkeln, die aber auch konfluieren können, vorkommt (Pallaske, 1961). Bei einer akuten Miliartuberkulose finden sich auch regelmäßig miliare Herde in der Nierenrinde. Großknotige Herde in den Nieren deuten auf das Vorliegen einer chronischen Nierentuberkulose hin (Pallaske, 1961). In der Milz sind in der Regel keine Veränderungen zu finden (Nieberle, 1938). Auch Knochen, vor allem die, die noch rotes Knochenmark enthalten, können nach hämatogener Erregerstreuung tuberkulöse Herde aufweisen (Nieberle, 1938).

#### **2.6.6.1.7 *Perlsucht***

Unter diesem Namen ist die Serosentuberkulose des Brust- und Bauchfells beim Rind bekannt. Die Bezeichnung „Perlsucht“ geht auf die perlartigen, runden, multiplen Wucherungen auf den Körperhöhlenauskleidungen zurück. In der Brusthöhle kann es zu einer adhäsiven chronischen Pleuritis kommen und auch der Herzbeutel kann, unter dem Erscheinungsbild des sogenannten Panzerherzens, mitbetroffen sein (Januschke, 1928).

#### **2.6.6.1.8 *Lymphknoten***

Läsionen in den Lymphknoten können entstehen, wenn sich eine tuberkulöse Veränderung im Einzugsgebiet des Lymphknotens befindet oder aber als Folge von Generalisierungsprozessen. Makroskopisch finden sich verkäsende Granulome mit Verkalkungsherden, häufig mehrere, die sich auch verbinden können und sich über den gesamten Lymphknoten erstrecken können (Zachary & McGavin, 2012). In Versuchen mit experimentell infizierten Rindern wurden die ersten makroskopischen Läsionen in Lymphknoten des Atmungstraktes zwischen 28 und 42 Tagen nach Inokulation gefunden. Zunächst bestanden die Veränderungen aus verkäsender Nekrose, später (ab Tag 42) traten auch einige mit verflüssigtem Material auf (Palmer et al., 2007).

### **2.6.6.2 Histologie**

#### **2.6.6.2.1 *Histopathologische Veränderungen***

In der Histologie präsentieren sich tuberkulöse Veränderungen in Form von Granulomen, deren Zentrum meist aus nekrotischem Material besteht, welches zum Teil Verkalkung aufweist. Darum sind Makrophagen (Epitheloidzellen) und LANGHANSschen Riesenzellen verteilt, um die sich ein Ring aus Lymphozyten anschließt; auch Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten treten auf. Nach außen schließt sich häufig eine Bindegewebskapsel an (Cassidy et al., 1999; Menin et al., 2013; Palmer et al., 2007; Palmer et al., 1999). Anhand des Auftretens der verschiedenen Komponenten wurden Einteilungsversuche vorgenommen. Bei der Untersuchung von experimentell infizierten Rindern, deren Gewebe histologisch an mittels Hämalaun-Eosin- und Ziehl-Neelsen-Färbung gefärbten Schnitten untersucht

wurden, wurde ein Schema zur Einteilung von Stadium I bis IV entwickelt (Wangoo et al., 2005). In Stadium I finden sich demnach Ansammlungen von Epitheloidzellen mit Lymphozyten und einigen neutrophilen Granulozyten, teilweise kommen auch mehrkernige Riesenzellen vor. In Granulomen von Stadium II kommen vorwiegend Epitheloidzellen vor, häufig auch mehrkernige LANGHANSsche Riesenzellen, sowie Infiltrate von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Außen werden sie von einer dünnen, teilweise ganz geschlossenen Bindegewebskapsel eingefasst. Kleine Nekroseareale treten manchmal auf. Granulome des Stadium III sind ganz eingekapselt und weisen eine zentrale verkäsende Nekrosezone auf, die von Epitheloidzellen und Riesenzellen umgeben ist. Daran schließt sich eine Zone aus Makrophagen mit Lymphozyten und einigen neutrophilen Granulozyten an. Im Stadium IV treten große, unregelmäßig verlaufende, multizentrische Granulome mit ausgedehnter Nekrose und Verkalkungsherden auf. Epitheloid- und Riesenzellen, sowie Lymphozyten umgeben die Nekroseareale. Eine dicke Bindegewebskapsel schließt die Läsion ein (Wangoo et al., 2005).

#### ***2.6.6.2.2 Erregernachweis in der Ziehl-Neelsen-Färbung***

Im Jahr 1882 beschrieb Robert Koch den erfolgreichen Nachweis der „Tuberkelbakterien“ im Gewebe. Er verbrachte die Gewebeschnitte in eine Farblösung, die aus einem Gemisch von destilliertem Wasser und alkoholischer Methylenblaulösung, versetzt mit 10 %-iger Kalilauge, bestand. Wurde diese Lösung auf 40° C im Wasserbad erwärmt, genügte es, die Schnitte darin für eine halbe bis zu einer Stunde verbleiben zu lassen. Danach wurden sie mit einer wässrigen Vesuvinlösung übergossen und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Nach derartiger Behandlung stellten sich die Zellkerne braun und die Bakterien blau dar (Koch, 1882). Paul Ehrlich wandelte diese Methode ab und nutzte zum Färben der Bakterien Fuchsin oder Methylviolett und anstelle der Kalilauge Anilinöl. Zum Entfernen der Farbe aus dem Gewebe verwendete er Salpetersäure, wobei jedoch die Bakterien ihre Farbe behielten (Ehrlich, 1882). Franz Ziehl wandte in weiteren Untersuchungen Ehrlichs Methode an, jedoch versetzte er nach missglückten Färbeversuchen mit Anilinöl die Färbelösung mit Carbolsäure. Daraufhin gelang der Versuch. Für weitere Untersuchungen verwendete er erfolgreich ein anderes Anilinöl, welches, nach seinen Vermutungen, eine Komponente mit ähnlicher Wirkung wie die

Carbolsäure enthielt (Ziehl, 1882). Eine weitere Entwicklung erfolgte durch Friedrich Neelsen, der als Färbeflüssigkeit Fuchsin mit Carbolsäure und einem Zusatz von Alkohol anwandte und seine Präparate mit Schwefelsäure wieder entfärbte (Neelsen, 1883). Auch Eduard von Rindfleisch trug zur Entwicklung dieser Methode bei, indem er die Objektträger anstelle der Färbelösung erhitzte (Bishop & Neumann, 1970). Auf diesem Wege entstand die heutige Ziehl-Neelsen-Färbung, bei der Carbofuchsin zum Anfärben, eine Mischung aus Salzsäure und Alkohol zum Entfärben und eine wässrige Methylenblaulösung zum Gegenfärben verwendet wird. Die säurefesten Stäbchen erscheinen daraufhin im Präparat rot und das Gewebe sowie andere Bakterienarten blau (Januschke, 1928).

Eine Abwandlung der Ziehl-Neelsen-Färbung zum Nachweis von *M. leprae* stellt die Fite-Faraco-Färbung dar. Hierbei werden die Schnitte in einem Gemisch aus Xylol und Erdnussöl entparaffiniert. Diese Methode ist schonender für die Zellwand des Lepraerregers, die im Vergleich zu der des Tuberkuloseerregers weniger säurefest ist (Reja et al., 2013). Weitere Veränderungen an der Ziehl-Neelsen-Methode betreffen häufig die Färbelösungen und sollen dazu dienen, die Technik weiter zu verbessern (Allen, 1992; Ellis & Zabrowarny, 1993).

Wangoo und Mitarbeiter (2005) wandten in ihrem Versuch auch die Ziehl-Neelsen-Färbung an, um die Verteilung säurefester Stäbchen innerhalb der verschiedenen Stadien der Granulome beurteilen zu können. Dabei stellten sie fest, dass die Anzahl säurefester Stäbchen mit dem Stadium der Granulome zunahm, wobei sich in Stadium IV am meisten fanden. In den frühen Stadien lagen die Bakterien vor allem innerhalb von Riesenzellen und Makrophagen, während sie sich in späteren vor allem in der Nekrosezone und auch in Verkalkungsherden fanden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Palmer und Mitarbeiter (2007) in ihren Untersuchungen, jedoch gab es einen Unterschied in der Anzahl säurefester Stäbchen in frühen Stadium I Granulomen (15 - 60 Tage nach Inokulation) und späten Stadium I Granulomen (über 90 Tage nach Inokulation). So fand sich in den frühen Granulomen eine moderate bis große Anzahl säurefester Stäbchen, während in späten nur wenige bis gar keine säurefesten Stäbchen aufzufinden waren. Menin und Mitarbeiter (2013) entdeckten säurefeste Stäbchen in Gewebeproben natürlich infizierter Rinder vor allem in Nekrosezonen, weniger in

Makrophagen, Riesenzellen oder Verkalkungsherden. In einer Studie mit Proben von natürlich infizierten Rindern aus England und Wales wurden in tuberkulösen Läsionen typischerweise nur wenige säurefeste Stäbchen nachgewiesen, und es konnte kein Zusammenhang zwischen ihrer Anzahl und dem Stadium der Granulome festgestellt werden (Liebana et al., 2008).

Die Ziehl-Neelsen-Färbung stellt zwar eine simple und relativ schnelle Nachweismethode dar, jedoch wird als Nachteil häufig eine geringe Sensitivität genannt (Varello et al., 2008; Watrelot-Virieux et al., 2006). In der Studie von Watrelot-Virieux wurden nur in 6 von insgesamt 39 Proben säurefeste Stäbchen nachgewiesen. Mit allen anderen Methoden (Auramin O/Rhodamin Färbung, Immunhistologie und bakteriologische Untersuchung) konnten in deutlich mehr Fällen Mykobakterien nachgewiesen werden. In der Studie von Varello und Mitarbeitern lag die Sensitivität bei 33,9 %. Bei einem Vergleich mit einer immunhistochemischen Methode in Geweben von Ziegen und Rindern wurden in 52 % der Fälle säurefeste Stäbchen gefunden, während ein positives Signal in der Immunhistologie in 64 % der Proben entdeckt wurde. Dieser Unterschied soll damit zusammenhängen, dass mit der immunhistochemischen Methode auch Bakterienfragmente und tote Organismen detektiert werden, während sich mittels der Ziehl-Neelsen-Färbung nur intakte, lebende Bakterien anfärben lassen (Gutierrez Cancela & Garcia Marin, 1993).

#### **2.6.6.2.3 Fluoreszenzfärbungen**

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Mykobakterien stellt die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen und die anschließende Untersuchung unter einem Fluoreszenzmikroskop im Dunkelfeld dar. Benutzt werden dafür vor allem die Auramin O-Färbung und die Auramin-Rhodamin-Färbung. Die Bakterien zeigen in der Auramin O-Färbung grüne Fluoreszenz und in der Auramin-Rhodamin-Färbung eine gelbliche (Hendry et al., 2009; Holani et al., 2014). Mittels einer schnellen, modifizierten Auramin O-Färbung konnten Hendry und Mitarbeiter (2009) in ihrem Versuch die Hintergrundfärbung reduzieren und die Bakterien erschienen heller, was es dem Untersucher erleichtern soll, Erreger im Probenmaterial aufzufinden.

#### **2.6.6.2.4 Immunhistologie**

Für den immunhistochemischen Nachweis von Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplex gibt es vor allem aus der Humanmedizin einige Belege. Es sind dabei polyklonale (Purohit et al., 2007; Ulrichs et al., 2005) und monoklonale Antikörper (Goel & Budhwar, 2007) getestet worden. Während ein polyklonales anti-*M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guerin) Antiserum auch mit Corynebakterien, Aktinomyces, Nocardien und *Staphylococcus aureus* kreuzreagiert (Ulrichs et al., 2005), sind der polyklonale anti-MPT64 Antikörper und der monoklonale Antikörper gegen ein 38 kDA Antigen spezifisch für *M. tuberculosis*-Komplex Mitglieder (Goel & Budhwar, 2007; Purohit et al., 2007). Vor allem der immunhistochemische Nachweis mittels des o.g. monoklonalen Antikörpers wird als effiziente ergänzende Methode zur konventionellen Ziehl-Neelsen-Färbung angesehen. Im direkten Vergleich wurde mit dieser Methode in allen Geweben von Tuberkulosepatienten ein positives Signal erzielt, während mit der Ziehl-Neelsen-Färbung nur in 36 % der Fälle säurefeste Stäbchen in den Proben nachgewiesen werden konnten (Goel & Budhwar, 2007).

#### **2.6.6.2.5 In situ-Hybridisierung**

Auch die Anwendung dieser Methode ist vor allem in der Humanmedizin beschrieben (Rodriguez-Nunez et al., 2012; Stender et al., 1999b; Zerbi et al., 2001). In allen drei aufgeführten Versuchen wurden Peptidnukleinsäuresonden verwendet, die aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften die mykobakterielle Zellwand gut penetrieren können (Stender, et al., 1999a). Es handelt sich dabei um Nukleinsäureanaloga, bei denen anstelle des Zuckerphosphatgerüsts der DNA und RNA organische Polymere, hier N-(2-Aminoethyl)glycin, das Grundgerüst bilden (Zerbi et al., 2001). Die *in situ*-Hybridisierung erwies sich nach Angaben der Autoren sowohl in Sputummaterial (Stender et al., 1999b) als auch in Gewebeproben (Rodriguez-Nunez et al., 2012; Zerbi et al., 2001) als schnelle, einfache und effiziente Methode.

#### **2.6.6.2.6 Elektronenmikroskopie**

Die Elektronenmikroskopie wird weniger als diagnostisches Verfahren sondern mehr zur eingehenderen Untersuchung mykobakterieller Zell- und Zellwandstrukturen genutzt (Hosseini et al., 2014; Kanai et al., 1981; Takade et al., 2003; Yamada et al., 2010). Dabei findet vor allem die Transmissionselektronenmikroskopie Anwendung



(Hosseini et al., 2014; Yamada et al., 2014; Yamada et al., 2010).

## 2.7 Differentialdiagnosen

Als Differentialdiagnosen zur Lungentuberkulose beim Rind kommen aufgrund der Dyspnoe und des Hustens die enzootische Bronchopneumonie, ein Befall mit Lungenwürmern sowie ein Echinokokkenbefall der Lunge in Frage. Der Unterschied zur Bronchopneumonie besteht in deren akut fieberhaften Verlauf mit Veränderungen in den Spitzenlappen. Eine Pneumonie durch Lungenwürmer tritt vor allem bei jungem Weidevieh auf, die Tiere zeigen deutliche Krankheitsanzeichen mit kräftigen Hustenanfällen. Der Echinokokkenbefall geht mit sehr starker Atemnot einher (Januschke, 1928). Als weitere Differentialdiagnosen erwähnt Januschke das interstitielle oder alveoläre Lungenemphysem, sowie die Lungenseuche. Pallaske (1961) erwähnt ferner metastatische aktinomykotische Lungenherde, die mit ihrem graugelblichen, weichen Granulationsgewebe morphologisch tuberkulösen Herden ähneln können.

Differentialdiagnostisch zur Eutertuberkulose kommen nach Januschke (1928) akute Euterentzündungen durch andere Erreger, die sich durch eine heiße, schmerzhafte Schwellung des Euters und Veränderungen der Milch äußern, sowie die chronische Streptokokkenmastitis und die Aktinomykose in Frage. Die chronische Streptokokkenmastitis sei nur durch eine bakteriologische Untersuchung zweifelsfrei zu diagnostizieren. Bei der Aktinomykose tritt keine Schwellung der Euterlymphknoten auf, außerdem können, im Gegensatz zur Tuberkulose, Fistelkanäle mit Eiter entstehen. Eine granulomatöse Enteritis mit zugehörigen klinischen Erscheinungen wie Abmagerung kann beim Rind auch durch *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Paratuberkulose oder Johnesche Krankheit) oder selten auch durch *M. avium* subsp. *avium* verursacht werden. Da die sich die Läsionen makroskopisch und histologisch untereinander sowie auch der Tuberkulose sehr ähneln, sollte zur eindeutigen Abklärung eine PCR erfolgen (Goepfert et al., 2014).

Bei einer Tuberkulose des Uterus, sind laut Pallaske (1961) eine Endometritis verursacht durch *Trueperella pyogenes*, bei der es zu Abszessbildung kommt, sowie eine Nekrobazillose in Betracht zu ziehen. Januschke (1928) erwähnt differentialdiagnostisch den chronischen Gebärmutterkatarrh.

Bei Veränderungen in Lymphknoten kann es sich neben Tuberkulose auch um andere Mykobakteriosen, Mykosen, Aktinomykose sowie um eine Infektion mit *Rhodococcus equi* handeln (Dürrling, 1991).

## 2.8 Therapie

Grundsätzlich ist eine Therapie der Rindertuberkulose möglich. Ein geeignetes Präparat stellt das Antibiotikum Isoniazid, auch Isonicotinsäurehydrazid, dar. In einigen Rinderbeständen in Südafrika konnte es erfolgreich zur Behandlung infizierter Tiere sowie zur Prophylaxe bei den restlichen Tieren angewendet werden (Dormer et al., 1961; Kleeberg, 1963). In Deutschland sind nach der Tuberkulose-VO Heilversuche verboten. Tiere, bei denen Tuberkulose festgestellt wird, werden getötet und unschädlich beseitigt. Außerdem werden alle Rinder des betroffenen Bestandes, die älter als sechs Wochen sind, mittels Tuberkulinprobe untersucht. Positive Reagenten werden ebenfalls getötet, bei einem zweifelhaften Ergebnis kann der Test nach frühestens sechs Wochen wiederholt werden oder ein Interferon- $\gamma$ -Freisetzungstest durchgeführt werden (Tuberkulose-VO).

## 2.9 Bekämpfungsprogramme

Nachdem die bovine Tuberkulose als eine Zoonose erkannt worden ist, wurden Programme zu ihrer Bekämpfung entwickelt. Ab 1900 wurde in Deutschland das Verfahren nach Ostertag durchgeführt (Schliesser, 1982). Es beruhte auf der Erkennung und Ausmerzung von an den offenen Formen der Tuberkulose erkrankten Tieren, also der offenen Lungentuberkulose, der offenen Gebärmutter- und Darmtuberkulose sowie der Eutertuberkulose. Ostertag selbst hielt eine Bekämpfung auf Basis des Tuberkulintestes in Deutschland für unmöglich, da zu viele Tiere reagieren würden und es „ein Ding der Unmöglichkeit“ wäre, sie alle aus den Beständen zu entfernen (v. Ostertag, 1928). Von 1890 bis 1920 wurde in Dänemark auf freiwilliger Basis in einzelnen Beständen die Methode nach Bernhard Bang durchgeführt. Dabei wurden die Tiere in den Beständen mittels Tuberkulin getestet und Reagenten und Nicht-Reagenten strikt voneinander getrennt (Hübner, 1956). Außerdem wurden Kälber nach der

Geburt von ihren Müttern getrennt und mit ausreichend erhitzter Milch oder Milch von tuberkulosefreien Kühen aufgezogen (v. Ostertag, 1928). Nachdem beide Methoden nicht den gewünschten Erfolg brachten, hat sich in allen Ländern mit Bekämpfungsmaßnahmen die Stamping-out Methode durchgesetzt. Sie beruhte auf dem regelmäßigen Testen der Herden mittels Tuberkulin und sofortiger Entfernung (oder Entfernung nach befristeter Nutzung) aller reagierenden Tiere (Hübner, 1956). Innerhalb der Europäischen Union ist der Handel mit Rindern in der Richtlinie 97/12/EG des Rates der EU geregelt, um die Krankheit nicht in evetnuell tuberkulosefreie Herden einzuschleppen. So können in tuberkulosefreie Bestände auch nur Tiere aus ebenfalls tuberkulosefreien Beständen zusammen mit der Bescheinigung eines Tierarztes eingeführt werden. Ein Tier älter als sechs Monate muss außerdem einem Tuberkulintest, mit negativem Ergebnis, unterzogen worden sein. In Deutschland ist der Umgang mit dieser Tierseuche durch die „Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes“ (Tuberkulose-VO) geregelt. Sie gibt vor, welche Schritte bei einem Verdacht nach der Untersuchung am Schlachthof oder im Falle einer positiven oder zweifelhaften Tuberkulinprobe einzuleiten sind und welche Maßnahmen im Falle eines Ausbruchs zu ergreifen sind.

## **2.10 Bovine Tuberkulose beim Menschen**

Wie bereits erwähnt, ist auch eine Infektion des Menschen mit *M. bovis* möglich. Lange Zeit stellte Milch die Hauptansteckungsquelle dar und verursachte vor allem bei Kindern schwere Formen der Tuberkulose: Meningitis und generalisierte Tuberkulose mit ulzerierenden Läsionen in der Lunge. Außerdem kann durch die alimentäre Aufnahme des Erregers eine weitere Streuung hin zu Knochen, Gelenken und Urogenitaltrakt stattfinden (Griffith, 1937). Des weiteren tritt bei oraler Infektion die Halslymphknotentuberkulose auf, während hingegen eine aerogene Infektion zur Ausbildung einer Lungentuberkulose führt (Brügger, 1950). Die Übertragung kann nicht nur vom Rind auf den Menschen, sondern auch vom Menschen wieder auf das Rind erfolgen. Untersuchungen in Nordbayern im Zeitraum von 1973 bis 1984 brachten zu Tage, dass in dieser Zeit mit *M. bovis* infizierte Menschen den größten Risikofaktor für tuberkulosefreie Rinderbestände darstellten (Weber et al., 1988). In 16 Fällen konnten

dabei an boviner Tuberkulose erkrankte Menschen verantwortlich gemacht werden. Von ihnen waren 70 % an Lungentuberkulose und 30 % an Urogenitaltuberkulose erkrankt. In den Niederlanden wurde von einigen Fällen berichtet, in denen Angestellte mit renaler Tuberkulose in Kuhställe urinierten und so mehrere Tiere des Bestandes ansteckten (Huitema, 1969). Ein weiterer interessanter Fall stammt aus der Schweiz, bei dem im Dezember 1999 bei einem 72 Jahre alten Mann renale und pulmonale Tuberkulose verursacht durch *M. bovis* festgestellt wurde. Er hatte sich in seiner Kindheit damit angesteckt. Später arbeitete er gelegentlich in einem landwirtschaftlichen Betrieb mit Rinderhaltung. In diesem Bestand wurde im August 1998 bei einer Kuh Tuberkulose festgestellt und durch weitere Tuberkulintests noch andere infizierte Tiere ermittelt. Die *M. bovis*-Stämme, die von diesen Tieren isoliert wurden, wiesen Ähnlichkeiten zu denen auf, die aus Proben des 72-jährigen Mannes stammten (Fritsche et al., 2004).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial stammt von Rindern aus deutschen Tierbeständen, die im Rahmen von Bestandsuntersuchungen mittels intradermalem Tuberkulintest positiv oder zweifelhaft reagierten. Die Proben wurden im Zeitraum vom 16.01.2009 bis Oktober 2014 in der Tierkörperbeseitigungsanlage Kraftisried genommen. Zunächst erfolgte die Tötung der Tiere vor Ort, danach wurde eine eingehende Untersuchung der Tierkörper mit anschließender Probenentnahme verdächtiger Organe und Lymphknoten durchgeführt. Die Tiere zeigten keine klinischen Auffälligkeiten, waren bei gutem Allgemeinbefinden und wiesen einen guten Ernährungszustand auf. Die im Folgenden genannte Anzahl von 84 Tieren bezieht sich auf die Anzahl der beprobten Rinder mit makroskopisch auf Tuberkulose hindeutenden Läsionen. Ein Überblick über die Anzahl der beprobten Tiere und Anzahl derer mit veränderten Organen und Lymphknoten findet sich in der folgenden Tabelle (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Anzahl Tiere mit makroskopischen Veränderungen in Organen und Lymphknoten und Gesamtzahl beprobter Tiere

<b>Gewebeproben</b>	<b>Anzahl Tiere</b>
Lunge	11
Mediastinallymphknoten	20
Darm	1
Mesenteriallymphknoten	62
Leber	5
Portallymphknoten	11
Retropharyngeallymphknoten	6
<b>Tiere gesamt</b>	<b>84</b>

### **3.1.1 Fixierung der Proben und Anfertigen von Bildern**

Die Gewebeproben, bei denen es sich überwiegend um Mesenterial- und Mediastinallymphknoten sowie Lunge, Dünndarm, Leber, Retropharyngeal- und Portallymphknoten handelte, wurden direkt nach Entnahme für mindestens 24 Stunden in Formaldehyd bzw. mittels Klotz-Lösung (Anhang 2.1) fixiert. Von diesen fixierten Organproben wurden Photographien angefertigt anhand derer dann die Beschreibung der makroskopischen Veränderungen erfolgte.

### **3.1.2 Vorbereitung der Proben für die Histologie**

Die fixierten Gewebe wurden anschließend in ca. 5mm dicke und im Durchmesser ca. 1-2cm große Scheiben geschnitten und in Einbettungskassetten gelegt, wobei insgesamt 238 Proben entstanden. Daraufhin folgte die Einbettung in Paraffin.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Paraffineinbettung und Herstellung der Schnitte**

Im Einbettungsautomaten (Gewebeeinbettungsautomat, Histomaster Modell 2050/Di, Bavimed, Birkenau) wurden die zugeschnittenen Proben entwässert und in flüssiges Paraffin verbracht. Die einzelnen Bearbeitungsschritte sahen wie folgt aus:

- ◆ 30 min mit Aqua dest. spülen
- ◆ 2 x 1,5h 70%-iges Äthanol
- ◆ 2 x 1,5h 96%-iges Äthanol
- ◆ 2 x 1h 100%-iges Äthanol
- ◆ 2 x 30 min Xylol (SAV LP, Flintsbach a. Inn)
- ◆ 1,5 h Xylol
- ◆ 2h Paraffin 60°C (Sherwood Medical, St.Louis, USA)
- ◆ 3 h Paraffin 60°C

Mit der Ausgießstation (TBS 88 Paraffin Embedding, Medite Medizintechnik, Burgdorf) wurden die Proben in Paraffinblöcke ausgegossen und anschließend am Rotationsmikrotom (Microm GmbH, HM 315, Walldorf) ca. 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in ein auf 40° C temperiertes Wasserbad (Daglef Patz, Wankendorf) verbracht und geglättet. Von hier aus wurden sie auf Objektträger (76x26x1mm, Engelbrecht, Edermünde) aufgezogen und für 12 - 24h im Trockenschrank (Memmert, Schwabach) bei 40° C getrocknet.

Aus jedem Paraffinblock wurde ein Schnitt angefertigt, der mittels Hämalaun-Eosin-Färbung (H&E) und einer, der mittels einer modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung, die sogenannte säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, auf das Vorkommen von Mykobakterien untersucht wurde. In der Tabelle 3 findet sich ein Überblick über die Anzahl der Paraffinblöcke pro Organ und Lymphknoten, sowie die Gesamtzahl der Blöcke.

**Tabelle 3:** Anzahl der Paraffinblöcke der Organe und Lymphknoten und die Anzahl der Paraffinblöcke insgesamt

Gewebeproben	Anzahl Paraffinblöcke
Lunge	29
Mediastinallymphknoten	40
Dünndarm	1
Mesenteriallymphknoten	132
Leber	8
Portallymphknoten	14
Retropharyngeallymphknoten	14
<b>Paraffinblöcke gesamt</b>	<b>238</b>

### **3.2.2 Vorbereitung zur Färbung**

Zur Vorbereitung wurden die Schnitte für die säurefeste Färbung nach Fite-Faraco zweimal 10 Minuten in ein Xylol-Paraffinöl-Gemisch (Anhang 9.3.2.1) verbracht. Für die Hämalaun-Eosin-Färbung wurden sie 10 Minuten in Xylol entparaffiniert.

### 3.2.3 Hämalaun-Eosin-Färbung

- ◆ nach dem Entparaffinieren erfolgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-, 96%-, 70%-iges Äthanol, Aqua dest.)
- ◆ 5 min Hämalaun nach Mayer (Applichem, Darmstadt, A0884)
- ◆ 5 min in fließendem warmem Leitungswasser spülen
- ◆ in 0,5%igem HCl-Alkohol differenzieren, 2-5 mal eintauchen (Anhang 9.3.1.2)
- ◆ 5 min in fließendem warmem Leitungswasser spülen
- ◆ 2 min in Eosin-Lösung (Anhang 9.3.1.1) tauchen
- ◆ Spülen mit Aqua dest.
- ◆ in aufsteigender Alkoholreihe dehydrieren (70%-, 96%-, 100%-iges Äthanol)
- ◆ Verbringen in Xylol
- ◆ Eindecken mit Histokitt (No 1025/500, Karl Hecht GmbH, Sondheim/Rhön) und Deckgläsern (24x40mm, Engelbrecht, Edermünde)

### 3.2.4 Säurefeste Färbung nach Fite-Faraco

- ◆ 30-minütige Inkubation in Ziehl-Neelsen-Karbolfuchsin (Carl Roth, Karlsruhe, Nr. A130.1)
- ◆ 10 Minuten fließend und kalt wässern
- ◆ in 1%-iger HCl-Alkohol-Gebrauchslösung (Anhang 9.3.3.1) differenzieren, bis keine Farbe mehr abfließt
- ◆ 5 Minuten fließend und kalt wässern
- ◆ ca. 3x kurz in Methylenblau (AppliChem, Darmstadt, Nr. A1568) eintauchen
- ◆ 5 Minuten fließend und kalt wässern
- ◆ 2x 2sec in 100%-iges Äthanol eintauchen
- ◆ Verbringen in Xylol
- ◆ Eindecken mit Histokitt (No 1025/500, Karl Hecht GmbH, Sondheim/Rhön) und Deckgläsern (24x40mm, Engelbrecht, Edermünde)



Zur Verifizierung des Verfahrens wurde bei jeder Färbung eine Positivkontrolle mitgeführt. Dazu diente der Lymphknoten eines an Paratuberkulose erkrankten Tieres mit multifokalen Ansammlungen säurefester Stäbchen.

### **3.2.5 Mikroskopische Untersuchung der Präparate**

Die Präparate, die mit der säurefesten Färbung nach Fite-Faraco behandelt wurden, wurden mäanderförmig mittels 40-facher Objektiv-Vergrößerung durchgemustert. Die dafür aufgewendete Zeit betrug entsprechend der Größe des Schnittes 1 bis 4 Stunden. Alle Präparate, bei denen im ersten Durchgang keine säurefesten Stäbchen gefunden wurden, wurden mindestens ein weiteres Mal untersucht. Auch einige der positiven Präparate wurden ein zweites Mal durchgemustert.



## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Angaben zum Untersuchungsmaterial

Bei 84 der untersuchten Tiere konnten makroskopische Auffälligkeiten an den Organen festgestellt werden. Von diesen wurden Proben entnommen, aus denen insgesamt 238 Paraffinblöcke angefertigt wurden. Die Paraffinblöcke wurden histopathologisch mittels Hämalaun-Eosin- und einer modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung nach Fite-Faraco untersucht. Außerdem wurde am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit mittels PCR und bakteriologischer Untersuchung eine Infektion der Tiere mit *M. caprae* nachgewiesen.

### 4.2 Makroskopische Befunde

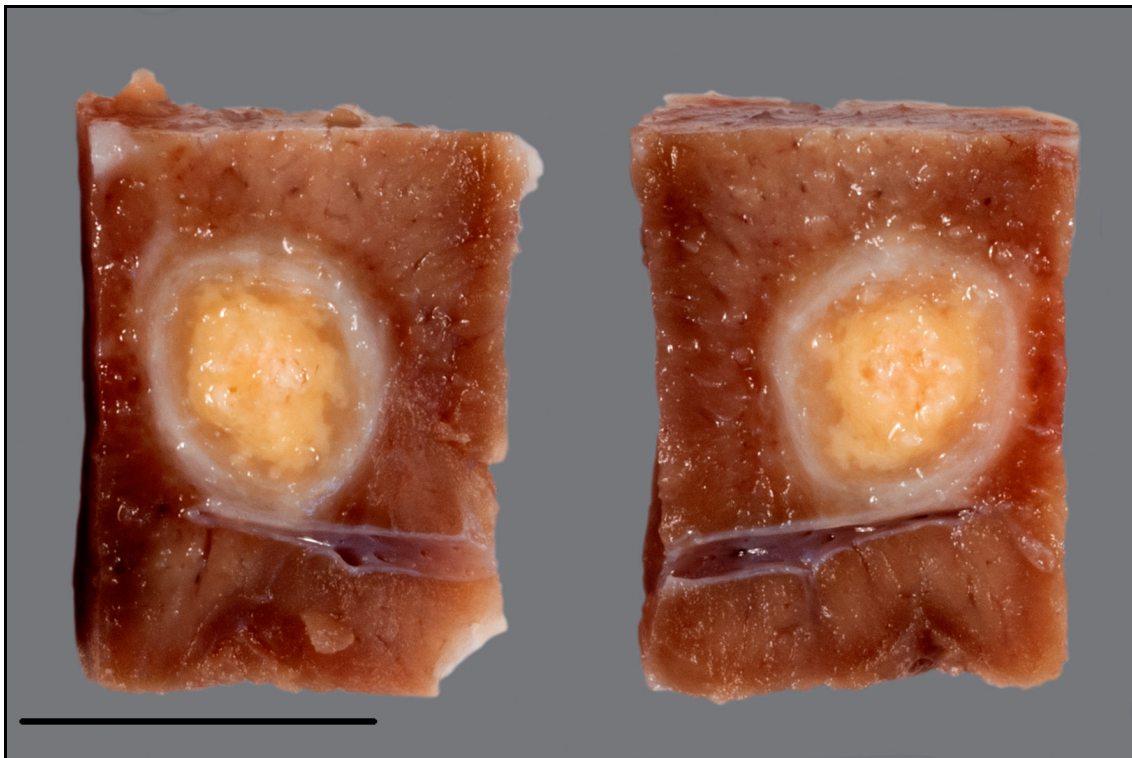
Die makroskopischen Befunde wurden anhand von angefertigten Bildern erhoben. Diese zeigten die Proben jeweils im Anschnitt. Bei der Durchsicht der Bilder fiel auf, dass sich bestimmte Muster in den Organen und Lymphknoten regelmäßig wiederholten. Alle Veränderungen waren von einem gelblichen Farbton, wobei im Falle einer zentralen Verkalkung sich diese heller darstellte. Bei 15 der 84 Tiere mit makroskopisch auf Tuberkulose hindeutenden Läsionen war mehr als ein Organsystem betroffen. Die makroskopischen Veränderungen wurden in fünf sogenannte Makro-Muster eingeteilt:

### **Makro-Muster I:**

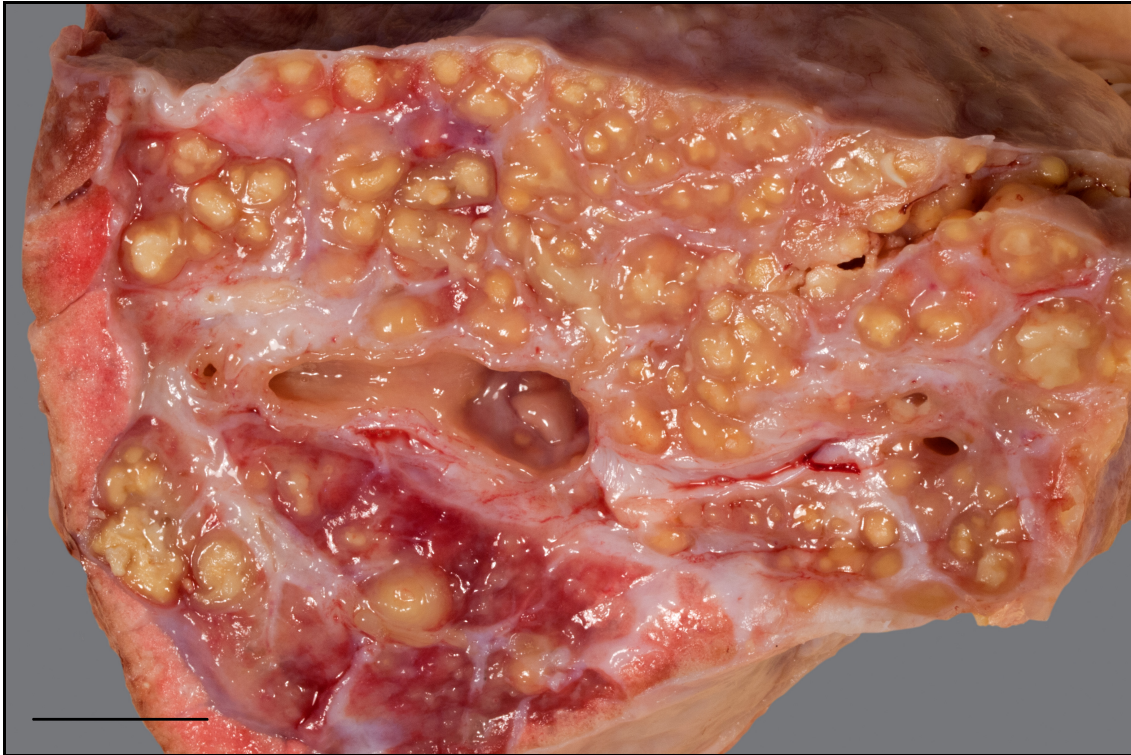
Es handelt sich um vereinzelte, rundliche, konzentrisch geschichtete und trockene Herde mit einem Durchmesser von ca. 1-2 cm. Diese traten entweder einzeln oder multifokal auf. Die Anordnung der Schichten war in allen Herden gleich. Außen lag eine weiß glänzende Kapsel, an die sich nach innen ein beige-bräunlicher Saum anschloss. Das Zentrum wurde von einer gelblichen Verkäsung gebildet, in der auch hellere Verkalkungsherde auftreten konnten (Abbildung 1).

### **Makro-Muster II:**

Diese makroskopischen Veränderungen stellten sich als multiple, rundliche und trockene Herde dar. Sie waren deutlich kleiner (Durchmesser ca. 2-5 mm) als die Herde des Makro-Musters I und sie zeigten, zumindest makroskopisch, keine konzentrische Anordnung (Abbildung 2).



**Abbildung 1:** Leber, einzelner, rundlicher, konzentrisch geschichteter und trockener Herd, entsprechend Makro-Muster I; mittels Klotz-Lösung fixiert (Maßstab = 1 cm)



**Abbildung 2:** Lunge, multiple, kleine und rundliche Herde, entsprechend Makro-Muster II; mittels Klotz-Lösung fixiert (Maßstab = 1 cm)

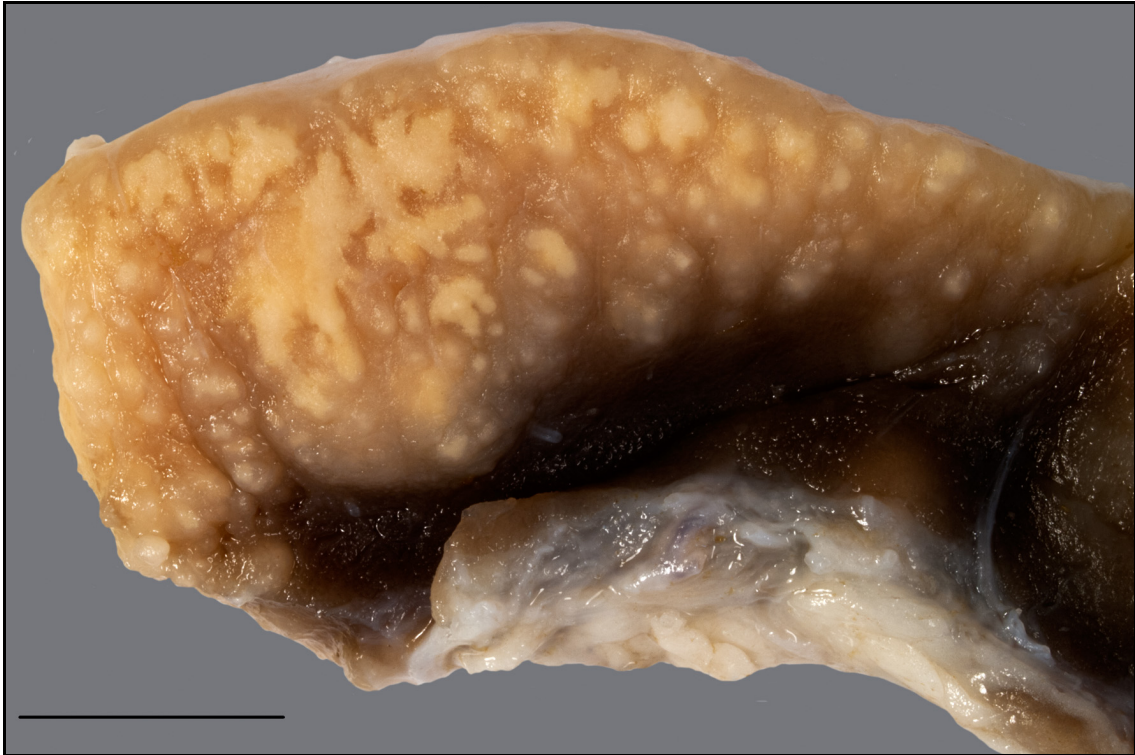
### **Makro-Muster III:**

Zu diesem Muster wurden einzelne bis multiple, unregelmäßig geformte Herde gezählt (Abbildung 3). Ihre Größe war variierend. Im Gegensatz zu Veränderungen der Makro-Muster I und II waren sie nicht rundlich geformt und zeigten keine eindeutig erkennbare Schichtung.

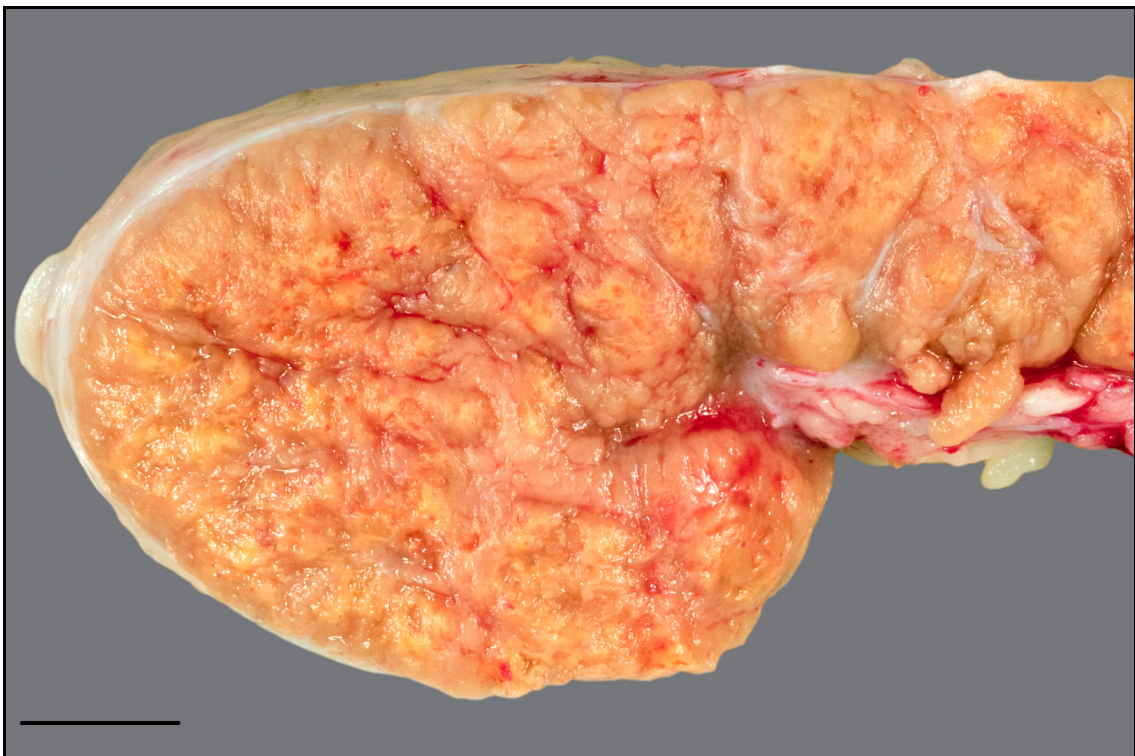
### **Makro-Muster IV:**

Hierbei handelte es sich um konfluierende, unregelmäßig geformte Herde, die größere Teile des Organs einnahmen, eine Schichtung war ebenfalls nicht zu erkennen (Abbildung 4).





**Abbildung 3:** Lymphknoten, multiple unregelmäßig geformte Herde, entsprechend Makro-Muster III; formalinfixiert (Maßstab = 1 cm)



**Abbildung 4:** Lymphknoten, konfluierende, unregelmäßig geformte und große Teile des Lymphknotens einnehmende Herde, entsprechend Makro-Muster IV; mittels Klotz-Lösung fixiert (Maßstab = 1 cm)

### **Makro-Muster V:**

Diese Läsionen zeichneten sich durch das Auftreten von Herden mit Einschmelzung der Verkäsung aus. Neben diesen Herden waren häufig Veränderungen im Sinne des Makro-Musters I vertreten (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Lunge, neben Herden nach Makro-Muster I sind auch Einschmelzungsherde (Hohlräume) entsprechend Makro-Muster V zu erkennen; formalinfixiert (Maßstab = 1 cm)

#### **4.2.1 Vorkommen der Makro-Muster im Probenmaterial**

In der Leber ( $n = 2$ ) sowie auch im Dünndarm ( $n = 1$ ) fanden sich ausschließlich Veränderungen, die dem Makro-Muster I entsprachen, wobei im Dünndarm nur ein einziger Herd aufgefunden werden konnte, während in den Leberproben mehrere vereinzelte Herde zu finden waren.

Das Spektrum der Läsionen in der Lunge umfasste dagegen Makro-Muster I, II, III und V. Zusätzlich erschien das umliegende Lungengewebe in manchen Proben um diese oben definierten Veränderungen verdichtet und ödematisiert und hatte eine



braunrötliche Farbe angenommen (Abbildung 6).

In den Lymphknoten waren alle fünf Makro-Muster vertreten, wobei Makro-Muster III am häufigsten vorkam (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Verteilung der fünf Makro-Muster in den Organen und Lymphknoten

	<b>Leber</b>	<b>Lunge</b>	<b>Darm</b>	<b>Lymphknoten</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Muster I</b>	2	4	1	16	23
<b>Muster II</b>	-	3	-	10	13
<b>Muster III</b>	-	1	-	42	43
<b>Muster IV</b>	-	-	-	5	5
<b>Muster V</b>	-	2	-	3	5



**Abbildung 6:** Lunge, einzelner, rundlicher und gelblicher Herd, darum verdichtetes und ödematisiertes Lungengewebe; mittels Klotz-Lösung fixiert (Maßstab = 1 cm)

Aufgrund der makroskopischen und histopathologischen Befunde (s. folgendes Kapitel), sowie des guten Allgemeinzustands der betroffenen Tiere wird angenommen, dass sie sich alle in der Primärinfektionsperiode befanden. Anhand von Tabelle 2 (s.



Material und Methoden) ist zu erkennen, dass bei vielen Rindern kein vollständiger Primärkomplex angetroffen wurde.

### 4.3 Histopathologische Befunde

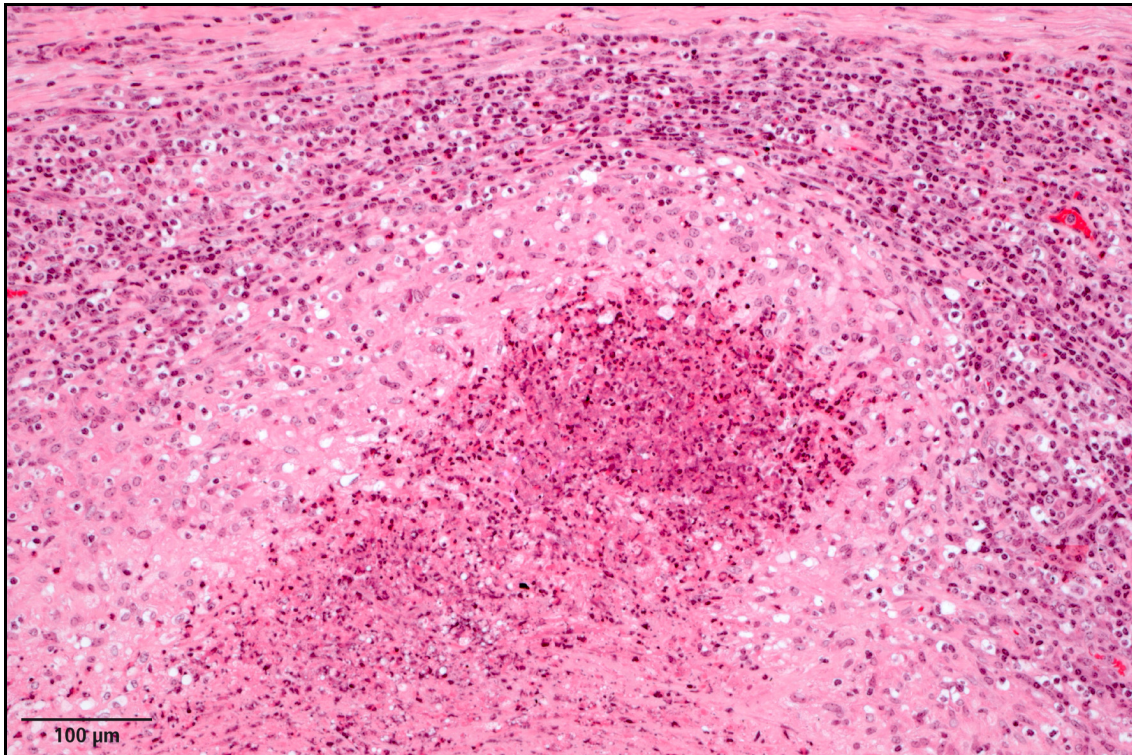
Von den 238 Paraffinblöcken wurden Präparate angefertigt und auf Anzeichen für eine Tuberkuloseinfektion untersucht. In 236 Präparaten fanden sich als Hinweis auf eine granulomatöse Entzündung vom Tuberkulose-Typ Ansammlungen von Epitheloidzellen und Lymphozyten, meist mit mehrkernigen Riesenzellen. In zwei Präparaten (Mesenteriallymphknoten) fanden sich ausschließlich kleine Ansammlungen von Makrophagen.

Nekrosezonen (Verkäsung) waren in 227 Präparaten zu finden, diese variierten von geringgradig bis hin zu großflächig ausgedehnt durch den Schnitt verlaufend. Vor allem um größere Verkäsungen herum war ein Saum aus Epitheloidzellen zu erkennen, teilweise mit einer variierenden Anzahl an Riesenzellen, worauf eine Zone aus Lymphozyten und Plasmazellen folgte. Um einige, vor allem um herdförmige Veränderungen, schloss sich außen eine Kapsel aus Bindegewebe (Fibrozyten und kollagene Fasern) an. Diese umgab die Läsion nicht immer vollständig. In manchen Fällen lag das Bindegewebe nicht als äußere Kapsel vor, sondern es zogen straßenartig mehrere Stränge zwischen mehreren Herden einer größeren Läsion hindurch. Das Vorkommen der einzelnen Komponenten der granulomatösen Entzündung vom Tuberkulose-Typ in den Paraffinschnitten kann der Tabelle 5 entnommen werden.

**Tabelle 5:** Anzahl und prozentualer Anteil der Präparate mit Vorkommen der einzelnen Komponenten der granulomatösen Entzündung

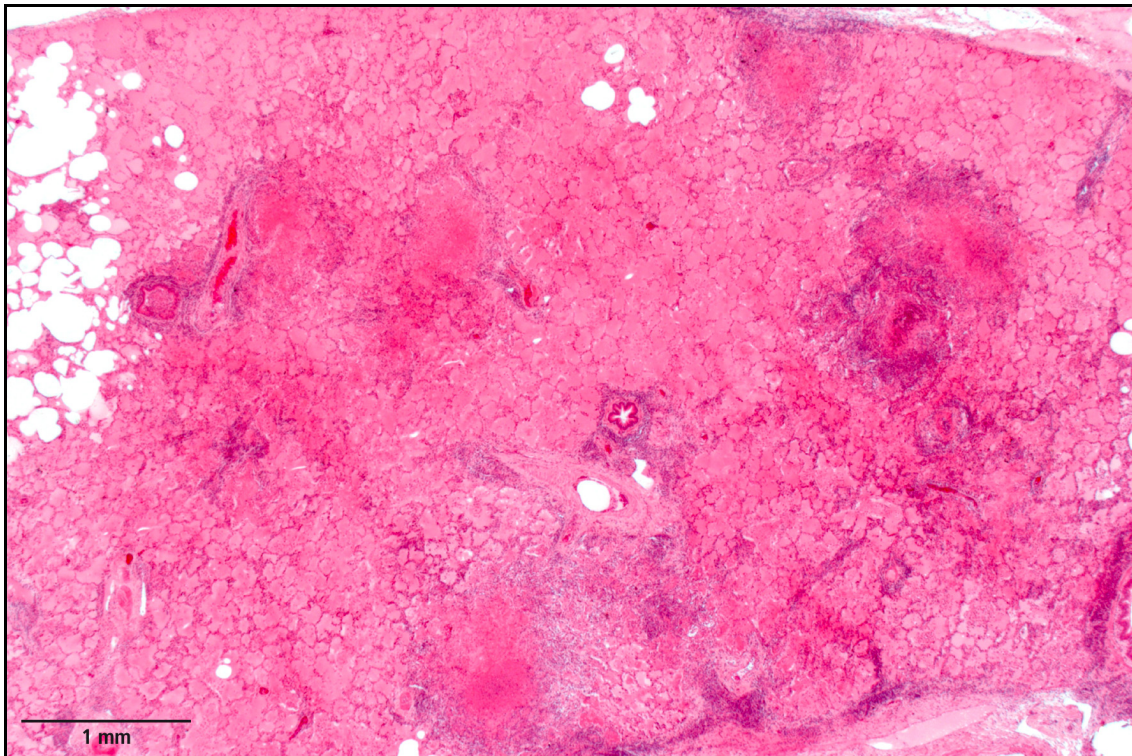
<b>Komponenten der granulomatösen Entzündung</b>	<b>Anzahl der Präparate</b>	<b>% der Präparate gesamt</b>
Epitheloid- und Riesenzellen	236	99
Nekrose	227	95
Verkalkung	186	78
Bindegewebe	173	72

Außerdem waren in einigen Präparaten Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten zu erkennen (Abbildung 7). Diese lagen häufig nestartig peripher um größere Nekrosezonen verteilt oder im Zentrum sogenannter Epitheloidzellgranulome (Ansammlungen von Epitheloid- und teilweise Riesenzellen vom LANGHANS-Typ) mit beginnender Nekrose.



**Abbildung 7:** Leber, Ansammlung zerfallender neutrophiler Granulozyten am Rand einer Nekrosezone eines Granuloms; H&E, E 110/09

In 10 der 29 Lungenpräparate (bei 6 von 11 Tieren mit makroskopischen Lungenläsionen) fanden sich Hinweise auf exsudative Prozesse. In einigen Präparaten waren die Alveolen großflächig mit eosinophilem Material gefüllt, stellenweise erschienen sie verdichtet und zu einem nekrotischen Areal verschmolzen (Abbildung 8). Bei einigen dieser Präparate war das Lumen der Bronchi und Bronchioli mit Massen an neutrophilen Granulozyten ausgefüllt, und in den Wänden fanden sich vereinzelt kleine Ansammlungen von Epitheloid- und Riesenzellen. Daneben kamen in diesen Präparaten auch Granulome mit zentraler Nekrose und Verkalkung, umgeben von einem Wall aus den oben genannten Entzündungszellen, sowie flächig ausgedehnte Nekrosezonen und Epitheloidzellgranulome vor.



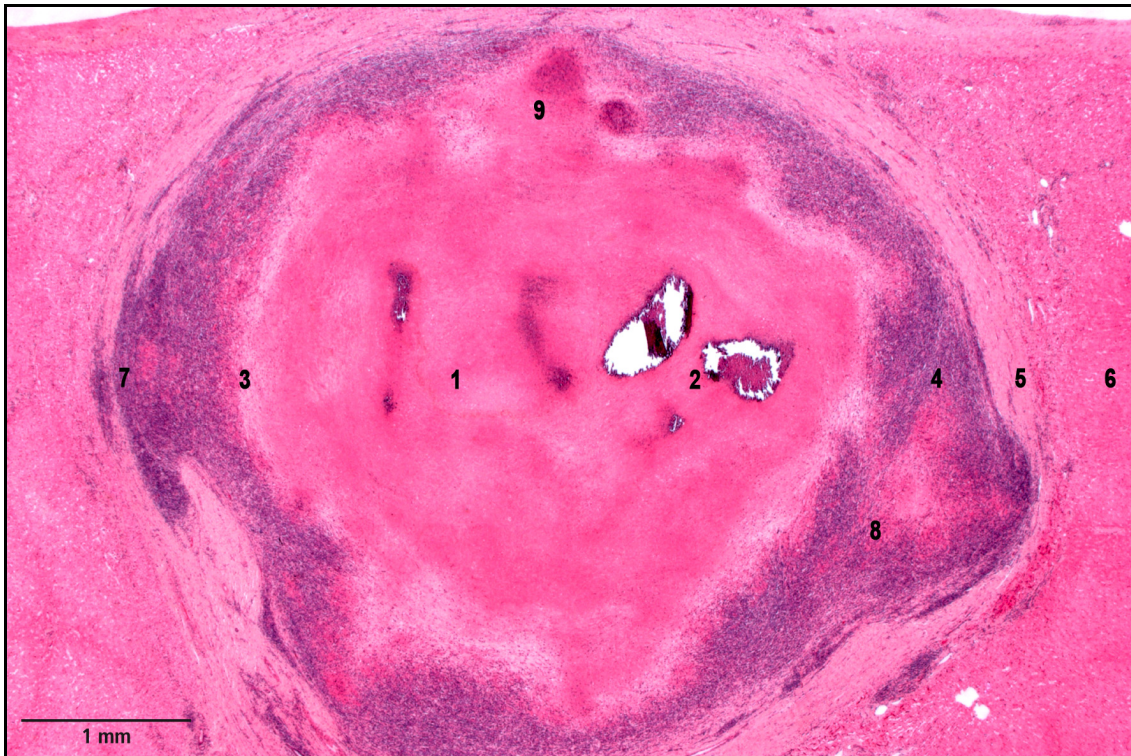
**Abbildung 8:** Lunge, Alveolen großflächig mit eosinophilem Material gefüllt, dazwischen zellreiche Areale mit zentraler Nekrose, am oberen linken Bildrand unverändertes Lungengewebe; H&E, E 322/09

Beim Betrachten der Präparate fiel auf, dass sich die Tuberkuloseläsionen in unterschiedlichen Erscheinungsformen darstellen. Diese wurden für die vorliegende Arbeit in folgende fünf Veränderungstypen eingeteilt:

### **Typ 1**

Hierbei handelt es sich um ein mehr oder weniger rundes Granulom mit zentraler Verkäsung und Verkalkung, umgeben von einem Ring aus Epitheloid- und Riesenzellen, woran sich ein Saum aus Lymphozyten und Plasmazellen anschließt. Außen wird das Granulom von einer Bindegewebskapsel umschlossen. Es können nestartige Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten auftreten (Abbildung 9). Dieser Veränderungstyp in der Histologie entspricht dem Makro-Muster I. Die zentrale Nekrose und Verkalkung erscheinen darin gelblich-weiß, die Zone aus Epitheloid- und Riesenzellen, sowie Lymphozyten und Plasmazellen bräunlich und die bindegewebige Kapsel weißlich.

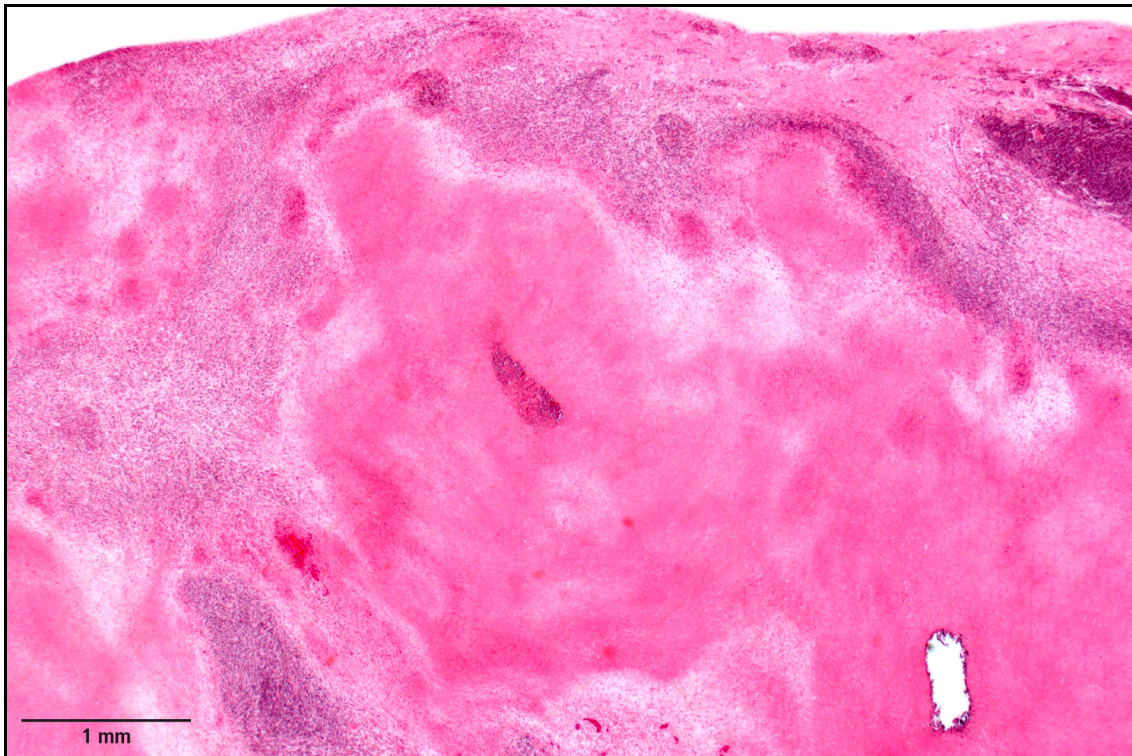




**Abbildung 9:** Leber, histologische Erscheinungsform der Tuberkulose Typ 1, rundes Granulom mit: 1 = zentraler Nekrose (Verkäsung), 2 = Verkalkung, 3 = Saum aus Epitheloid- und Riesenzellen, 4 = Lymphozytenzone, 5 = Bindegewebskapsel, außerdem: 6 = unverändertes Lebergewebe, 7 = Herd mit wenigen Makrophagen, 8 = Herd mit vielen Makrophagen, 9 = Herd mit zerfallenden neutrophilen Granulozyten; H&E, E 110/09

## Typ 2

Diese Erscheinungsform zeichnet sich durch das Auftreten einer häufig ausgedehnten, unregelmäßig durch das Gewebe verlaufenden Nekrosezone aus, die von Epitheloid- und Riesenzellen sowie Lymphozyten und Plasmazellen umgeben ist. Es können dabei auch Verkalkungsherde, häufig multipel, auftreten. Eine darum geschlossene Bindegewebskapsel kommt nicht vor, jedoch können stellenweise Bindegewebsstränge zwischen den Veränderungen auftreten. Auch hier können kleine Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten, vor allem in der Peripherie ausgedehnter Nekrosen, vorkommen. Diese Form ist aufgrund ihrer unregelmäßigen Ausdehnung im Gewebe nicht als Granulom, sondern als granulomatöse Entzündung zu bezeichnen (Abbildung 10).

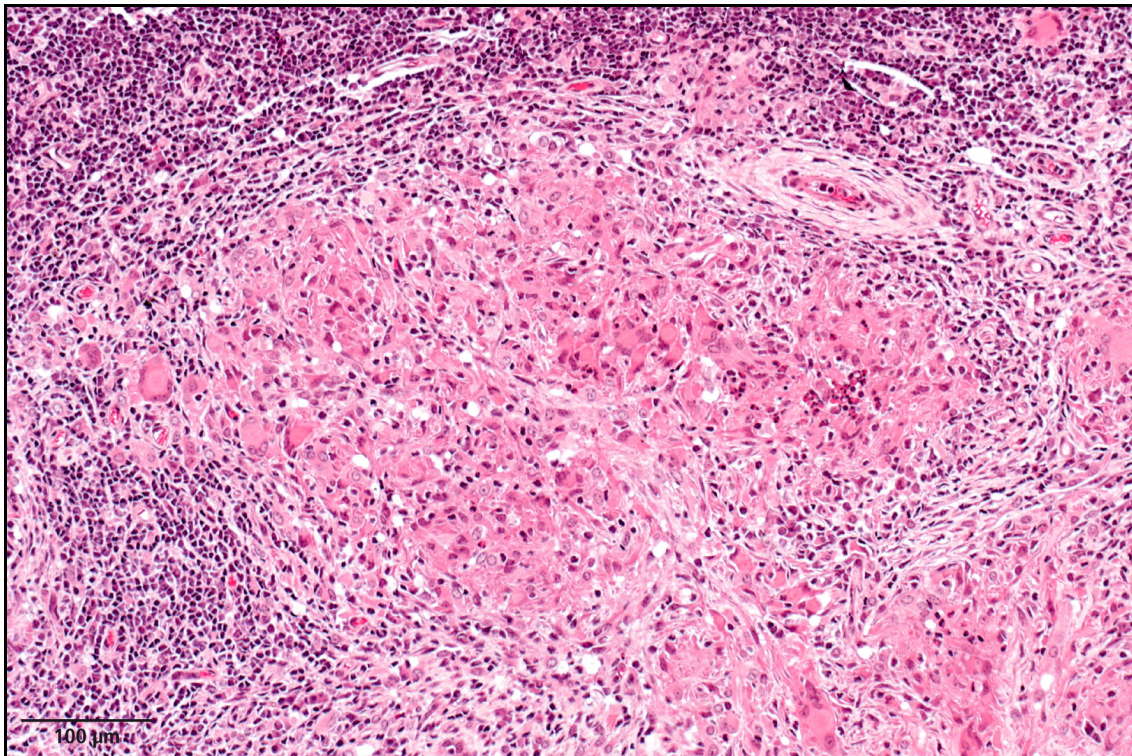


**Abbildung 10:** Portallymphknoten, histologische Erscheinungsform der Tuberkulose Typ 2, flächige, unregelmäßig verlaufende Nekrosezone, umgeben von Epitheloidzellen, Riesenzellen und Lymphozyten; H&E, E 110/09

### **Typ 3a**

Es treten nur Ansammlungen von Epitheloid- und Riesenzellen, die Epitheloidzellgranulome, auf (Abbildung 11). In den Präparaten kommen entweder mehrere dieser Epitheloidzellgranulome ohne eine der anderen Veränderungen vor, oder auch wenige Epitheloidzellgranulome in unmittelbarer Nachbarschaft zu größeren Veränderungen von Typ 1 oder 2.

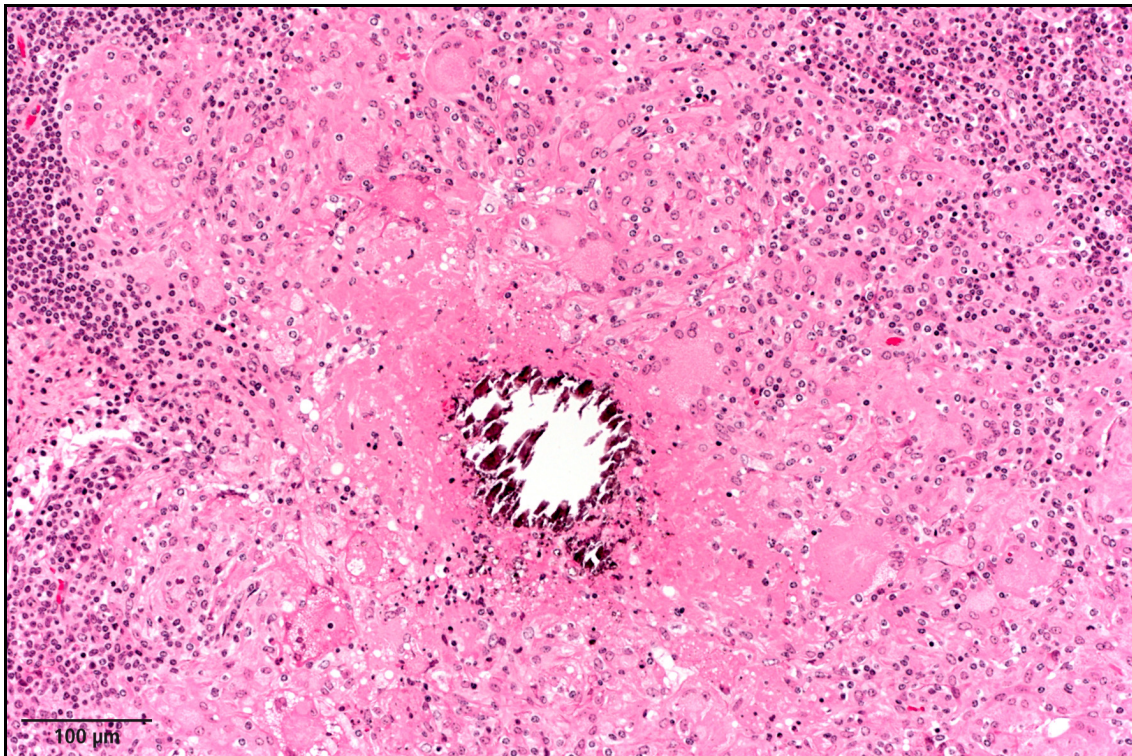




**Abbildung 11:** Mesenteriallymphknoten, histologische Erscheinungsform der Tuberkulose Typ 3a, Epitheloidzellgranulom; H&E, E 320/09

### **Typ 3b**

Hierbei handelt es sich ebenfalls um Ansammlungen von Epitheloid- und Riesenzellen, jedoch können diese zusätzlich eine Nekrose, Verkalkungsherde oder eine schmale Bindegewebskapsel aufweisen, bzw. alles zusammen. Gelegentlich finden sich auch hier, im frisch nekrotisierenden Zentrum, kleine Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten. Der Unterschied zur Veränderung des Typ 1 liegt darin, dass bei Typ 3b nicht unbedingt alle Komponenten (Nekrose, Verkalkung, Bindegewebe, Epitheloid- und Riesenzellen) gleichzeitig auftreten und Epitheloid- und Riesenzellen den überwiegenden Anteil der Läsion ausmachen (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Mesenteriallymphknoten, histologische Erscheinungsform der Tuberkulose Typ 3b, Epitheloidzellgranulom mit beginnender zentraler Nekrose und wenig Verkalkung; H&E, S 602/14

#### Typ 4

Hierbei handelt es sich um wenige herdförmige Veränderungen, die zwar zum Teil die verschiedenen Komponenten der granulomatösen Entzündung vom Tuberkulose-Typ beinhalten (Epitheloid- und Riesenzellen, Lymphozyten, Plasmazellen, Nekrose, Verkalkung), jedoch nicht in der regelmäßigen Schichtung und in einer anderen Verteilung als bei den oben genannten Typen. Zwei weitere Fälle zeichneten sich nur durch das Auftreten sehr kleiner Makrophagenansammlungen aus, die nicht dem Aussehen des Epitheloidzellgranuloms entsprachen.

Diese fünf verschiedenen histologischen Typen tuberkulöser Läsionen waren in den Präparaten teils zusammen, teils vereinzelt zu finden. Es wurde untersucht, wie oft welcher Veränderungstyp vorkommt. Tabelle 6 zeigt das Vorkommen dieser Typen in den Präparaten. Aufgrund des gemeinsamen Vorkommens mehrerer Veränderungstypen nebeneinander in vielen Präparaten ergibt die Addition dieser mehr als 238.



**Tabelle 6:** Anzahl der histologischen Präparate mit Vorkommen der verschiedenen Typen tuberkulöser Läsionen

<b>Veränderung</b>	<b>Anzahl Präparate</b>
<b>Typ 1</b>	103
<b>Typ 2</b>	134
<b>Typ 3a</b>	150
<b>Typ 3b</b>	73
<b>Typ 4</b>	6

Am häufigsten waren das Epitheloidzellgranulom (Typ 3a) und die große, flächige, unregelmäßig durch das Gewebe verlaufende Nekrosezone, umgeben vom typischen Zellspektrum der granulomatösen Entzündung vom Tuberkulose-Typ (Typ 2), zu finden. In 16 der 150 Präparate, in denen der Typ 3a tuberkulöser Läsionen vorkam, traten nur Epitheloidzellgranulome ohne weitere Veränderungen, bzw. in Verbindung mit Typ 3b auf, in den anderen Fällen waren sie entweder mit einer der Veränderungen vom Typ 1 (43/150 Präparate) oder Typ 2 (65/150 Präparate), oder mit beiden assoziiert. Typ 4 trat als Sonderform am seltensten auf.

Weiterhin wurde die Verteilung der verschiedenen Veränderungstypen in den Organen und Lymphknoten im Hinblick auf Gemeinsamkeiten und Abweichungen untersucht. Die Ergebnisse können Tabelle 7 entnommen werden.

**Tabelle 7:** Vorkommen der Veränderungstypen in den Proben (Anzahl Präparate) im Vergleich zu Gesamtzahl der Präparate. Pro Präparat traten häufig mehrere Typen auf.

	<b>Darm</b>	<b>Leber</b>	<b>Lunge</b>	<b>Mesenter- ial-LN</b>	<b>Mediasti- nal-LN</b>	<b>Portal- LN</b>	<b>Retropharyngeal- LN</b>
<b>Typ 1</b>	1	6	23	31	22	10	10
<b>Typ 2</b>	–	–	9	95	17	5	8
<b>Typ 3a</b>	–	1	18	89	25	9	8
<b>Typ 3b</b>	–	1	11	37	14	4	6
<b>Typ 4</b>	–	1	–	4	–	1	–
<b>Präparate gesamt</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>29</b>	<b>132</b>	<b>40</b>	<b>14</b>	<b>14</b>



In den Organen Leber und Darm überwiegt das klassische, runde, gut abgegrenzte Granulom gegenüber der flächig ausgebreiteten granulomatösen Entzündung mit Nekrose, während diese Form im Mesenteriallymphknoten die vorherrschende darstellt. In den anderen Lymphknoten stellt sich die Verteilung der unterschiedlichen Typen ausgeglichener dar. In den betroffenen Lungen findet sich häufiger zusätzlich ein akutes Lungenödem in der Umgebung der tuberkulösen Veränderungen.

## **4.4 Ergebnisse der Fite-Faraco-Färbung**

### **4.4.1 Verteilung säurefester Stäbchen in den Organen und Lymphknoten**

Von den 84 untersuchten Tieren konnten bei 70 in der Fite-Faraco-Färbung (FF), nach ausgiebiger und mehrfacher systematischer Durchmusterung der Präparate, säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden, was einem Anteil von 83 % entspricht. Bei 2 Tieren waren histologisch nur kleine Makrophagenansammlungen und einzelne sehr kleine Epitheloidzellgranulome zu finden und es konnten darin keine säurefesten Stäbchen nachgewiesen werden. Insgesamt wurden in 163 der 238 Paraffinschnitte (68 %) säurefeste Stäbchen gefunden. In den Organen und Lymphknoten waren sie mit unterschiedlichen Häufigkeiten anzutreffen. So waren sie in den Lymphknoten häufiger zu finden als in Leber und Lunge. Es gab nur ein Tier mit einer Veränderung im Darm, die aus einem einzelnen Herd mit wenigen Millimetern im Durchmesser bestand. Stäbchen konnten häufiger in den Mediastinal- (in 88 % der positiven Präparate) als in den anderen Lymphknoten nachgewiesen werden. Weitere Angaben zur Anzahl der in der Färbung nach Fite-Faraco positiven Präparate sind in Tabelle 8 zu finden.

**Tabelle 8:** Organe und Lymphknoten, die histologisch auf das Vorkommen von säurefesten Bakterien untersucht wurden mit Angabe der Anzahl der insgesamt untersuchten und der Anzahl der positiven Präparate

Gewebeproben	Anzahl Präparate	Davon FF positiv
Lunge	29	17
Leber	8	3
Darm	1	1
Mesenteriallymphknoten	132	87
Mediastinallymphknoten	40	35
Retropharyngeallymphknoten	14	10
Portallymphknoten	14	10
<b>Präparate Gesamt: 238</b>		

Eine detaillierte Übersicht zu den histologischen Veränderungstypen in den einzelnen Proben mit Ergebnissen der säurefesten Färbung ist in Tabelle 13 (Anhang 9.1) zu finden.

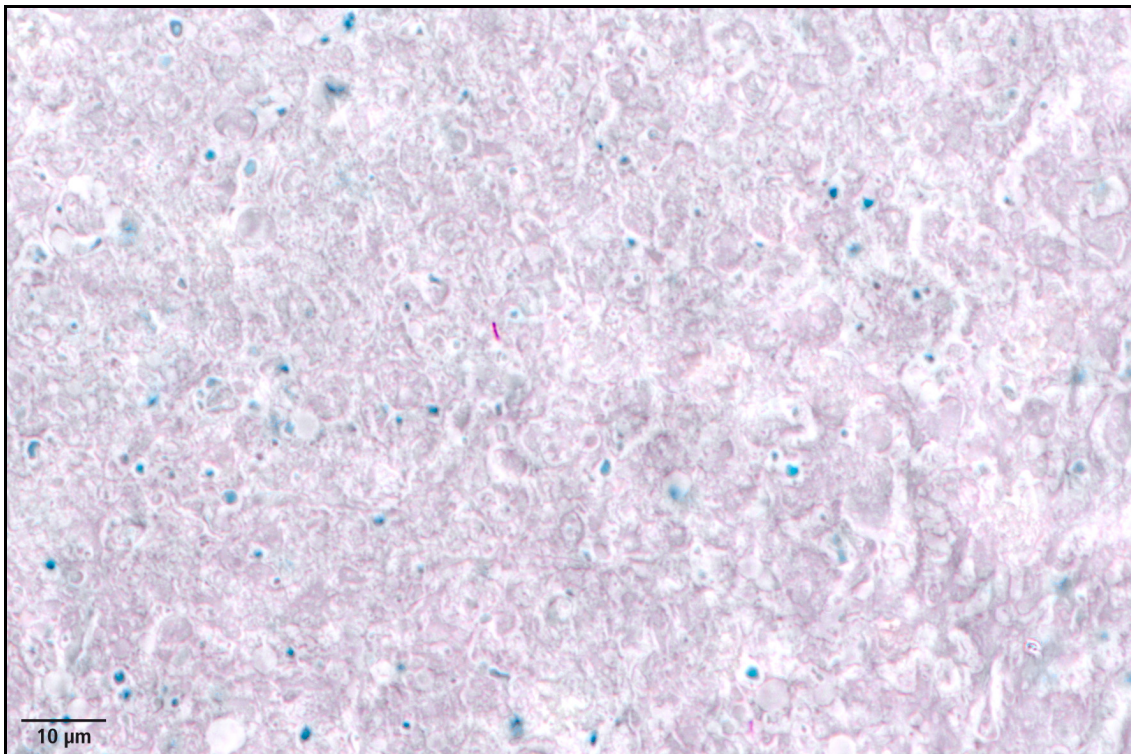
#### **4.4.2 Verteilung säurefester Stäbchen in den Läsionen**

Innerhalb der Läsionen kommen die Stäbchen in den Lokalisationen Nekrose, Verkalkung, mehrkernige Riesenzellen oder Epitheloidzellen vor. Es konnte nicht immer mit Sicherheit festgestellt werden, ob ein Stäbchen intrazellulär in einer Epitheloidzelle oder extrazellulär lag, da häufig die Zellgrenzen schlecht auszumachen waren. Die in der vorliegenden Arbeit als in Epitheloidzellen liegend aufgeführten Stäbchen fanden sich alle sehr dicht am Zellkern, weswegen davon ausgegangen wurde, dass sie intrazellulär lagen.

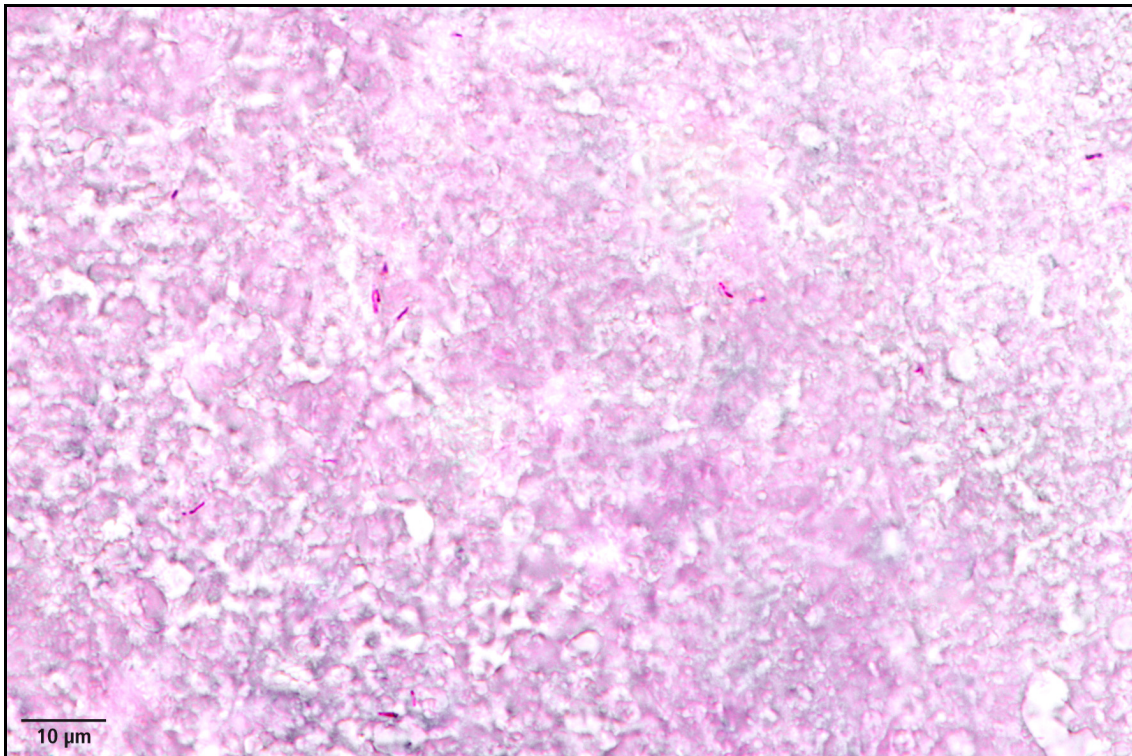
In 69 % der positiven Präparate konnten Bakterien in der Nekrosezone nachgewiesen werden (Abbildungen 13 und 14), in 21 % lagen sie in einem Verkalkungsherd. Intrazellulär waren sie vor allem in Riesenzellen anzutreffen, in denen sie häufig sogar in Gruppen von bis zu 5 Stäbchen lagen. In 41 % der positiven Präparate waren dort (Riesenzellen) säurefeste Stäbchen nachweisbar, in 27 % lagen sie in Epitheloidzellen. Die Häufigkeit des Auftretens von Stäbchen in diesen Lokalisationen innerhalb der Läsion kann der Tabelle 9 entnommen werden.

**Tabelle 9:** Anzahl Präparate mit Vorkommen säurefester Stäbchen in den Lokalisationen innerhalb der Läsion

Auftreten in...	Anzahl Präparate
Nekrose	113
Verkalkung	34
Epitheloidzellen	44
Riesenzellen	68



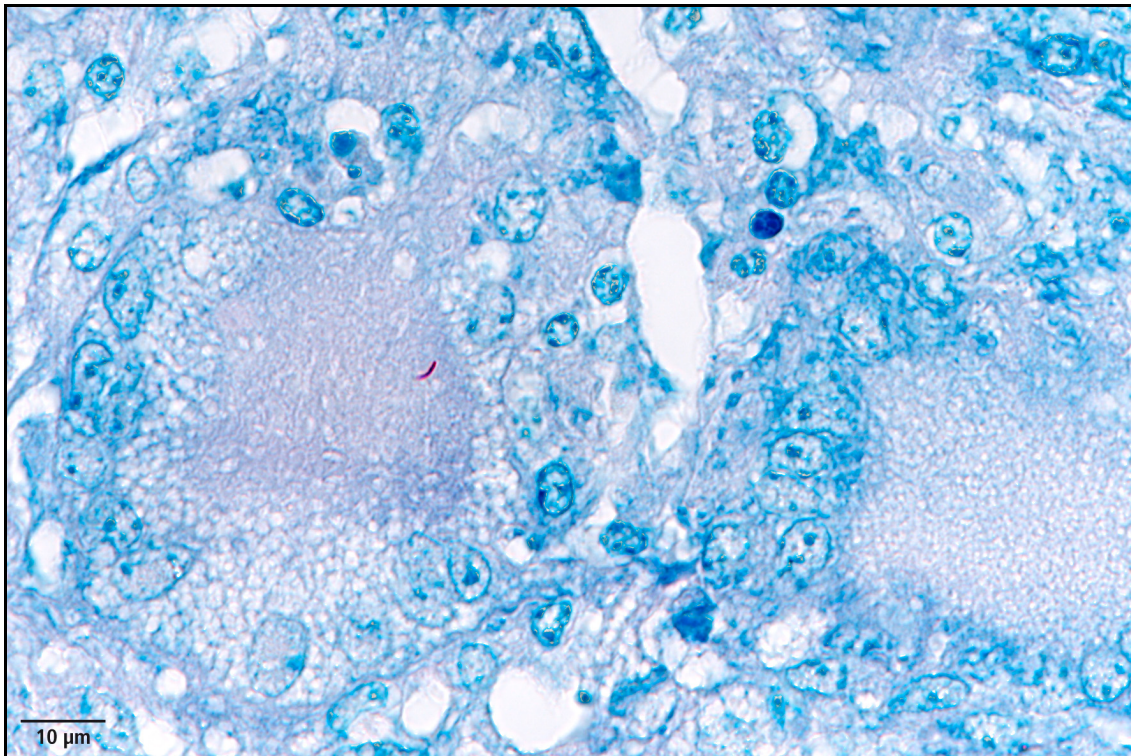
**Abbildung 13:** Mesenteriallymphknoten, meistens waren nur einzelne säurefeste Stäbchen in Nekrosezonen zu finden; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco S 128/13



**Abbildung 14:** Mediastinallymphknoten, einige wenige säurefeste Stäbchen in einer Nekrosezone; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 126/13

Des weiteren sind die einzelnen Organe und Lymphknoten auf das Vorliegen von Nekrose, Verkalkung, Epitheloid- (EZ) und Riesenzellen (RZ), sowie die Verteilung der säurefesten Stäbchen darin untersucht worden (Tabelle 10). Am häufigsten waren säurefeste Stäbchen in der Nekrose und in Riesenzellen in den Mesenteriallymphknoten anzutreffen (Abbildung 15).





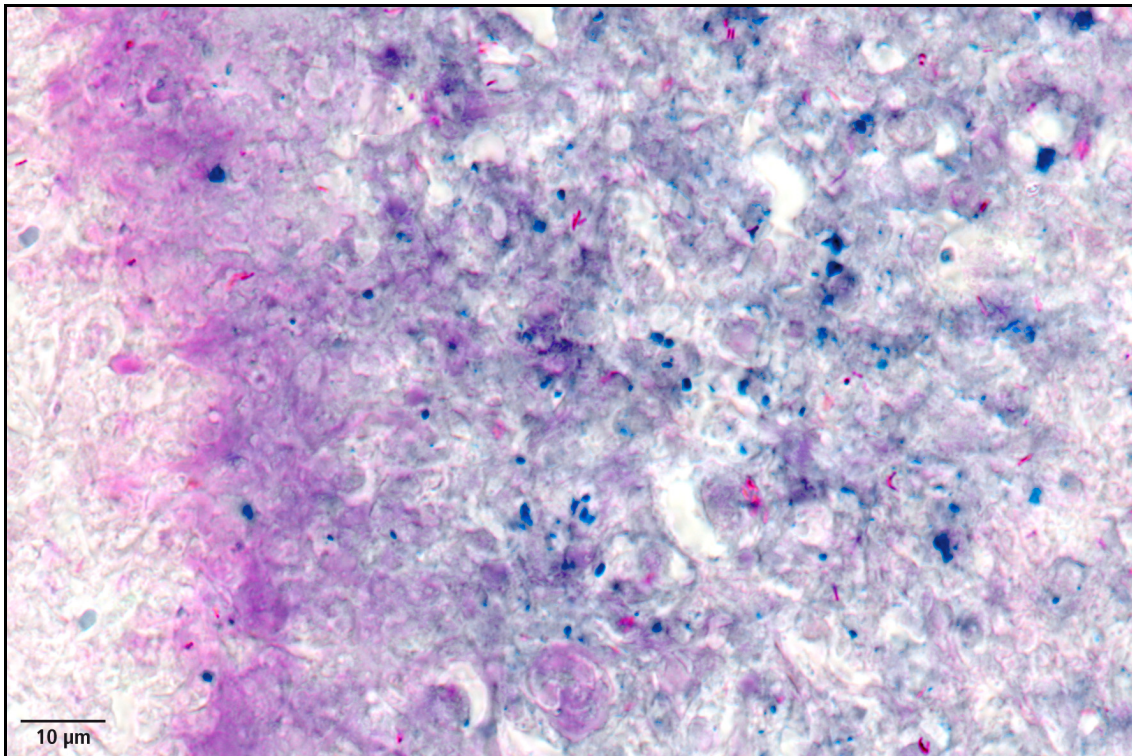
**Abbildung 15:** Mesenteriallymphknoten, häufig auftretendes Bild mit einem einzelnen säurefesten Stäbchen in einer Riesenzelle; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 415/14

**Tabelle 10:** Verteilung säurefester Stäbchen in den verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Organe und Lymphknoten (Zahlen entsprechen Anzahl der Präparate)

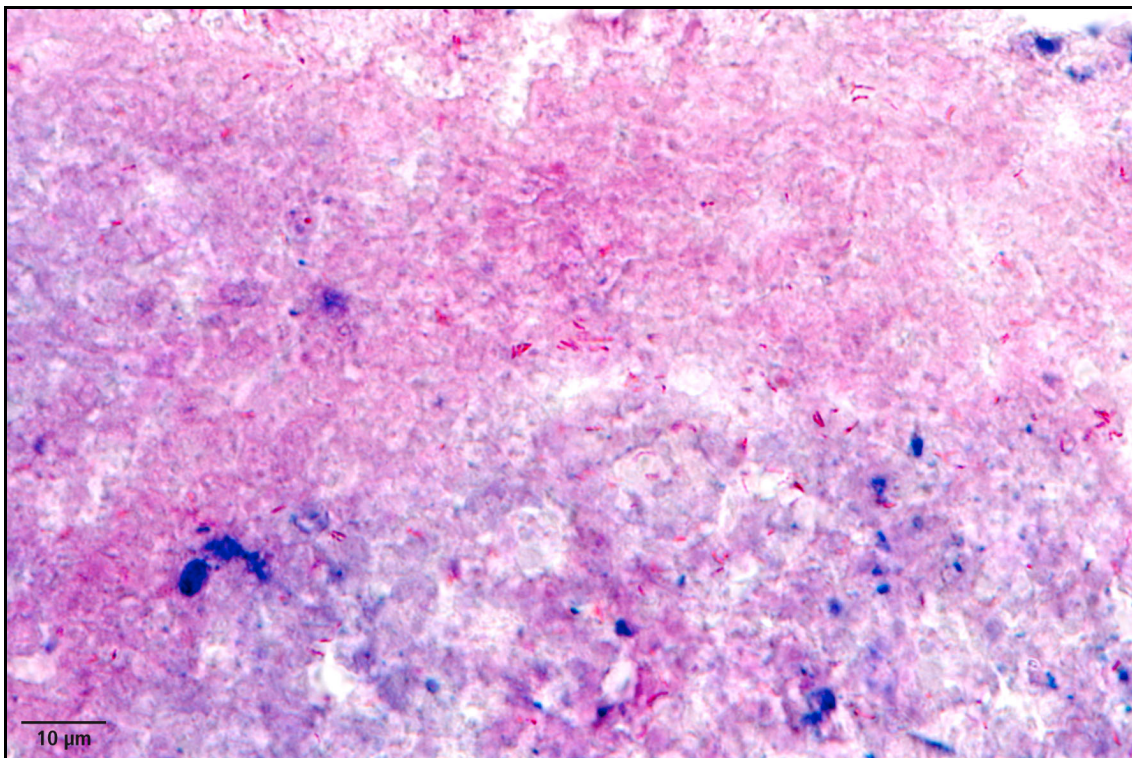
	Lunge	Leber	Darm	Mesenterial-LN	Mediastinal-LN	Retro-pharyngeal-LN	Portal-LN
<b>Nekrose</b>	13	2	–	66	18	6	8
<b>Verkalkung</b>	1	–	–	27	5	–	1
<b>Epitheloidzellen</b>	5	–	–	24	11	3	1
<b>Riesenzellen</b>	5	1	1	31	18	6	6

In Verkalkungsherden kamen sie dagegen nicht so häufig vor, dann aber lagen meist gleich mehrere beieinander. Kamen in einem Präparat viele säurefeste Stäbchen vor, so waren in der Regel sehr viele davon in Verkalkungsherden und der direkt angrenzenden Nekrosezone zu finden (Abbildung 16). Dort lagen sie häufig zu mehreren, zum Teil in großen Gruppen, beieinander (Abbildung 17), während andere Verkalkungs- und Nekrorestellen völlig frei blieben.





**Abbildung 16:** Mesenteriallymphknoten, Übergang von Verkäsung (links) in Verkalkung (rechts) mit Auftreten säurefester Stäbchen in beiden Komponenten bzw. Lokalisationen; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 179/13



**Abbildung 17:** Mesenteriallymphknoten, viele säurefeste Stäbchen in einem Verkalkungsherd; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 179/13

Nach der Einteilung der histologischen Erscheinungsformen der Tuberkulose in Typen wurden die Präparate auf das Vorkommen säurefester Stäbchen in diesen untersucht. Die Anzahl der Präparate, in denen innerhalb des jeweiligen Typs säurefeste Stäbchen auftraten, wurde der Anzahl Präparate, in denen der jeweilige Typ von Veränderung vorkam, gegenübergestellt (Tabelle 11). In 75 % der Präparate mit Veränderungen des Typ 2 wurden säurefeste Stäbchen am häufigsten nachgewiesen.

**Tabelle 11:** Vorkommen unterschiedlicher Typen tuberkulöser Läsionen und Anzahl davon in der säurefesten Färbung positiven Präparate

<b>Typ</b>	<b>Präparate mit Vorkommen dieses Typs insgesamt</b>	<b>davon positiv in der säurefesten Färbung</b>
<b>1</b>	103	37
<b>2</b>	134	100
<b>3a</b>	152	43
<b>3b</b>	73	17
<b>4</b>	6	1

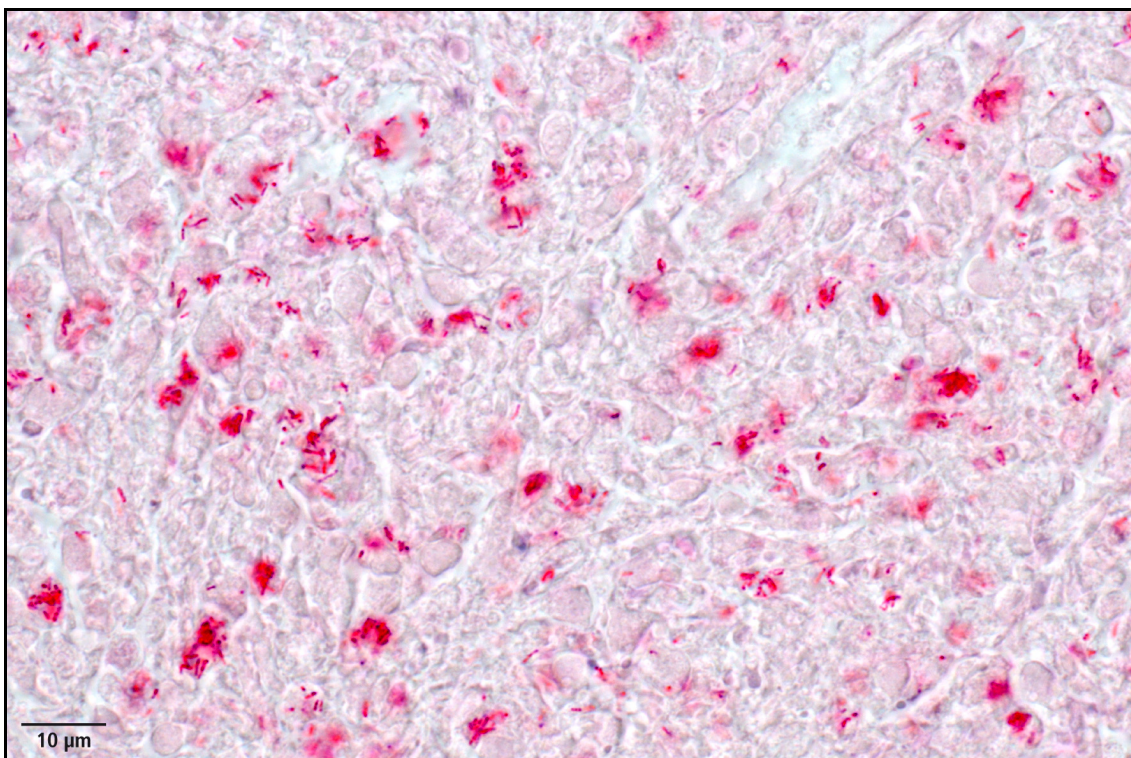
Innerhalb der verschiedenen Typen tuberkulöser Läsionen waren zum Teil auch die unterschiedlichen Komponenten Nekrose, Verkalkung, Epitheloid- und Riesenzellen als Lokalisationen anzutreffen. Die Verteilung säurefester Stäbchen in diesen wurde untersucht und dokumentiert. Die genauen Angaben dazu sind in Tabelle 12 zu finden.

**Tabelle 12:** Verteilung säurefester Stäbchen in den unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb der Typen tuberkulöser Läsionen. Die Zahlen stehen für die Anzahl der Präparate, in denen innerhalb einer bestimmten Komponente eines Typs säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden konnten („/“ = kommt in diesem Typ nicht vor; „–“ = keine säurefesten Stäbchen darin gefunden)

<b>Anzahl Präparate mit säurefesten Stäbchen in</b>	<b>Typ 1</b>	<b>Typ 2</b>	<b>Typ 3a</b>	<b>Typ 3b</b>	<b>Typ 4</b>
<b>Nekrose</b>	26	81	/	10	–
<b>Verkalkung</b>	7	28	/	1	–
<b>Riesenzellen</b>	11	28	25	7	1
<b>Epitheloidzellen</b>	1	20	23	4	–

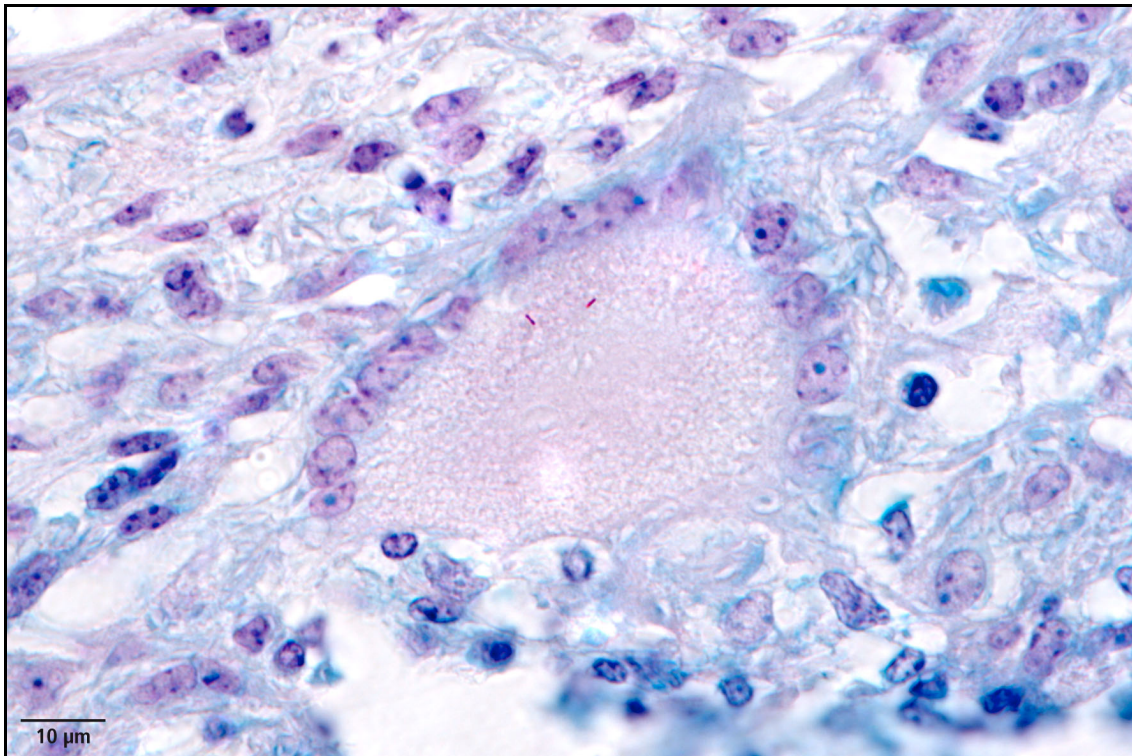


In allen histologischen Veränderungstypen, in denen Nekrose vorkommt (Typ 1, 2 und 3b), sind in dieser Nekrose säurefeste Stäbchen am häufigsten anzutreffen, jedoch nur in Ausnahmefällen tatsächlich auch in großen Mengen (Abbildung 18). Innerhalb der Veränderung vom Typ 3a sind sie in Epitheloid- und in mehrkernigen Riesenzellen vom LANGHANS-Typ nahezu gleichermaßen zu finden (Abbildung 19 und 20), jedoch können in Riesenzellen manchmal mehrere Bakterien vorkommen (Abbildung 19). Außerdem sind sie in Riesenzellen oft leichter zu entdecken (aufgrund des gleichförmigen Hintergrundes).

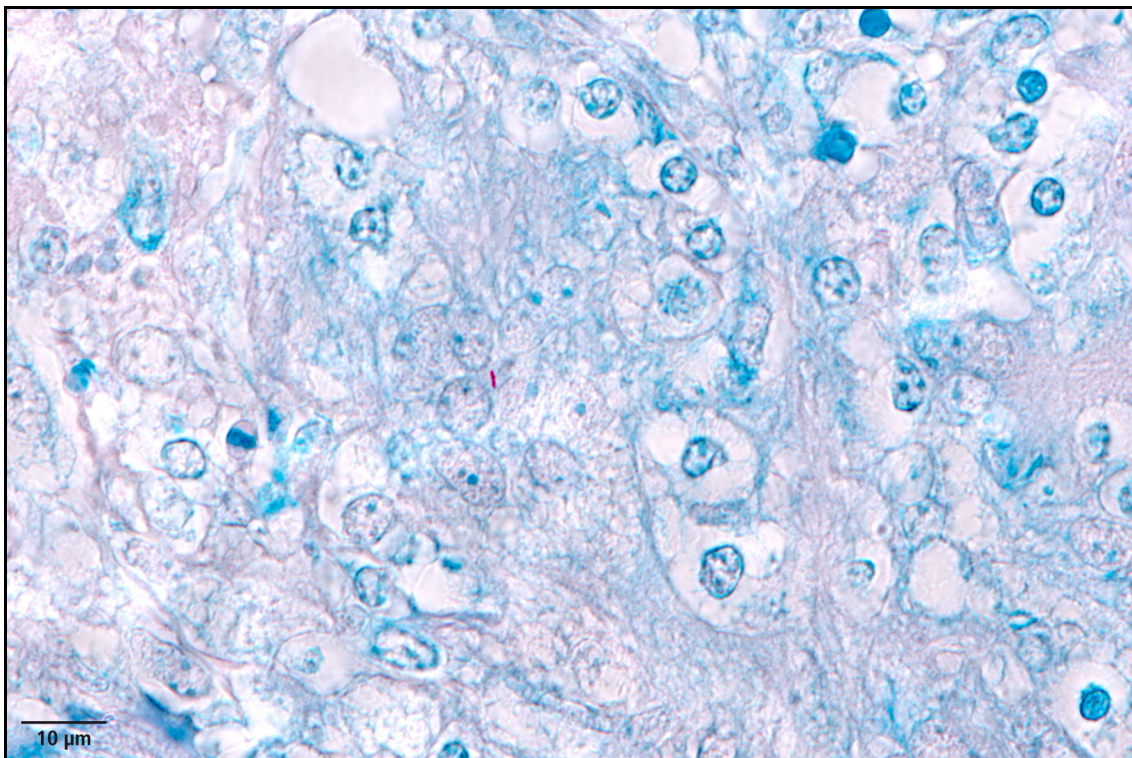


**Abbildung 18:** Mesenteriallymphknoten, sehr viele säurefeste Stäbchen in Nekrosezone des Veränderungstyps 2; ein solches Bild war nur selten anzutreffen; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, E 102/09





**Abbildung 19:** Mediastinallymphknoten, zwei säurefeste Stäbchen im Zytoplasma einer mehrkernigen Riesenzelle; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 126/13



**Abbildung 20:** Mesenteriallymphknoten, ein säurefestes Stäbchen zwischen Epitheloidzellen; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 128/13



## 5 DISKUSSION

*M. caprae* ist seit 2009 für Ausbrüche boviner Tuberkulose im südlichen Teil Deutschlands verantwortlich. Wichtige postmortale Diagnostiktechniken für die Feststellung einer Tuberkulose sind neben der PCR und kulturellen Anzucht auf speziellen Nährböden die histopathologische Untersuchung mit Nachweis säurefester Stäbchen in der Ziehl-Neelsen-Färbung von makroskopisch veränderten Geweben. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, histopathologische Veränderungen zu beschreiben und ein Einteilungsschema für die vorgefundenen Läsionen zu erstellen, mit dem die Verteilung säurefester Stäbchen in den verschiedenen Gewebeproben erfasst werden sollte. Außerdem sollte ermittelt werden, wo innerhalb der unterschiedlichen Läsionen am häufigsten Stäbchen vorzufinden sind. Dazu wurden von makroskopisch veränderten Gewebeproben von 84 Rindern aus deutschen Tierbeständen Paraffinschnitte angefertigt, die mittels Hämalaun-Eosin- und einer modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung (FF) untersucht wurden.

### 5.1 Makroskopische Befunde

Aufgrund des sehr guten Allgemeinzustands, des Fehlens klinischer Symptome sowie der makroskopischen Erscheinung der Läsionen in den Organen und Lymphknoten wird davon ausgegangen, dass sich die für die vorliegende Arbeit untersuchten Tiere in der Primärinfektionsperiode im Sinne von Nieberle (1938) und Pallaske (1961) befanden. In keiner der Organproben gab es Anzeichen für das Vorliegen einer chronischen isolierten Organtuberkulose, außerdem waren in den vorliegenden Fällen die regionären Lymphknoten regelmäßig mitbetroffen. Gegen eine Form der Spätgeneralisation sprechen die geringe Größe der Veränderungen (Durchmesser der meisten 0,5 - 1 cm) und ihr häufig vereinzelter Auftreten sowie der gute Allgemeinzustand der Tiere. Vergleicht man die Anzahl der Paraffinblöcke der Organe (38), also Lunge, Leber und Dünndarm mit der Anzahl an Paraffinblöcken der Lymphknoten (200) so fällt auf, dass die letzteren bei weitem überwiegen (rund 85 % der Blöcke insgesamt). Es wurde folglich in vielen Fällen kein vollständiger Primärkomplex angetroffen. Pallaske (1961)

beschreibt, dass im Darm häufig kein vollständiger Primärkomplex anzutreffen ist und sich Veränderungen oftmals nur in den regionären Lymphknoten finden lassen. Dies würde den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit entsprechen, da viele makroskopisch veränderte Mesenteriallymphknoten vorgefunden wurden, aber nur bei einem Tier auch ein veränderter Dünndarm. Eine weitere Erklärung für die nur unvollständig vorgefundenen Primärkomplexe wäre, wie bereits in der Literatur beschrieben (Cassidy, 2006), dass in den großen Organen ausgewachsener Rinder beim routinemäßigen Anschneiden kleine Herde leichter übersehen werden können als vergleichbare in Lymphknoten. McIlroy und Mitarbeiter (1986) haben für ihre Studie Rinderlungen systematisch in 5mm dicke Scheiben geschnitten und konnten somit in 73 % der Fälle dort Läsionen feststellen. Dieses Verfahren wurde jedoch mittels eines Baconslicer im Labor durchgeführt, was aufgrund der Probenentnahme vor Ort in einer Tierkörperbeseitigungsanlage für die vorliegende Arbeit nicht möglich war.

## **5.2 Interpretation histopathologischer Befunde**

Das häufig verwendete histopathologische Einteilungsschema der Läsionen in Stadien I-IV von Wangoo und Mitarbeitern (2005) wurde für die vorliegende Arbeit nicht angewandt, da es sich um Proben natürlich infizierter Rinder handelte, während von den genannten Autoren mit experimentell infizierten Tieren gearbeitet wurde. Jedoch wurden diese Tiere nicht zeitlich nacheinander getötet und untersucht, sondern alle zum gleichen Zeitpunkt nach Inokulation, weswegen nicht ganz klar sein kann, ob es sich wirklich um zeitlich aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien handelt. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Einteilung nach morphologischen Erscheinungsformen, sozusagen eine Momentaufnahme, angewandt, der keine Annahmen über die zeitliche Abfolge zugrunde liegen. Jedoch sind in den beiden genannten Arbeiten in Grundzügen die gleichen histopathologischen Bilder beobachtet worden. So entspricht das hier als Veränderungstyp 3a bezeichnete Epitheloidzellgranulom in der Beschreibung dem Entwicklungsstadium I bei Wangoo und Mitarbeitern, der Veränderungstyp 3b dem Entwicklungsstadium II, und das klassische Granulom, unser Veränderungstyp 1, ähnelt sehr dem Entwicklungsstadium III. Bei unserem Veränderungstyp 2 und dem Entwicklungsstadium IV sind zwar viele

Parallelen vorhanden (große, unregelmäßige, multizentrische Granulome mit Verkäsung und einigen Verkalkungsherden, umgeben von Epitheloid- und Riesenzellen sowie Lymphozyten), jedoch soll zu Stadium IV eine ausgeprägte bindegewebige Kapsel gehören, die das Granulom einfasst, während bei Veränderungstyp 2 eine Kapsel häufig sogar fehlt. Es kann zwar reaktiv zugebildetes Bindegewebe auftreten, jedoch stellt sich dieses auch häufig nur in Form von vereinzelt Straßen dar, die zwischen Läsionen hindurch ziehen, ohne eine eindeutige Kapsel zu formen. Außerdem waren bei Veränderungen vom Typ 2 oft nur unregelmäßig geformte Nekrosezonen, die auch teilweise nur wenig ausgedehnt verliefen und eher klein waren, ohne Verkalkungsherde anzutreffen. Palmer und Mitarbeiter (2007) fügten den Entwicklungsstadien nach Wangoo und Mitarbeitern (2005) eine zeitliche Komponente hinzu, indem sie Rinder experimentell infizierten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inokulation euthanasierten und untersuchten. Für die Beobachtung der zeitlichen Entwicklung wurde bei jedem Tier der mediale Retropharyngeallymphknoten begutachtet. Dabei wurde festgestellt, dass 15 Tage nach Inokulation (post inoculationem, p.i.) als erste Veränderung Granulome des Stadium I auftraten. Am Tag 28 p.i. kamen Granulome des Stadium II hinzu, am Tag 42 p.i. traten Granulome von Stadium I-III auf. Ab Tag 60 p.i. waren alle vier Entwicklungsstadien vertreten. Sie waren häufig alle gemeinsam oder in unterschiedlichen Kombinationen nebeneinander anzutreffen (Palmer et al., 2007). Dies beobachteten auch Liebana und Mitarbeiter (2008) in ihrem Untersuchungsmaterial natürlich infizierter Rinder. Auch hier traten mehrere Entwicklungsstadien gleichzeitig auf (Liebana et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls beobachtet, dass häufig mehrere Veränderungstypen nebeneinander vorkommen. Dies spricht vermutlich für ein bis zum Zeitpunkt des Todes zumindest lokal noch aktives entzündliches Geschehen.

Bei 2 von 84 Tieren waren histologisch zwar Anzeichen für das Vorliegen einer granulomatösen Entzündung (Vorkommen von Makrophagen, Epitheloid- oder Riesenzellen) in den Mesenterilallymphknoten zu erkennen, jedoch wird aufgrund der Abwesenheit säurefester Stäbchen und des wenig spezifischen histologischen Bildes vermutet, dass es sich hierbei nicht um Tuberkulose handelt.

### 5.3 Interpretation der Ergebnisse der Fite-Faraco-Färbung

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass sich säurefeste Stäbchen vor allem innerhalb großer Nekrosezonen des Veränderungstyps 2 sowie intrazellulär in Riesenzellen und Epitheloidzellen der Epitheloidzellgranulome nachweisen lassen. Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Studien an natürlich (Menin et al., 2013) und experimentell infizierten Rindern (Cassidy et al., 1999; Palmer et al., 2007; Wangoo et al., 2005), die ebenfalls berichten, dass säurefeste Stäbchen hauptsächlich in großen Nekrosezonen und Riesenzellen, oft auch Epitheloidzellen vorgefunden wurden. Jedoch beziehen sich die meisten Autoren dabei nicht auf einen speziellen Veränderungstyp oder ein Entwicklungsstadium, sondern bleiben allgemein. Nur Wangoo und Mitarbeiter (2005) berichten auch vom Auftreten in verkalkten Bereichen. In der vorliegenden Arbeit wurden in nur 34 von 186 Präparaten mit Vorkommen von Verkalkung säurefeste Stäbchen angetroffen, dafür enthielten diese Verkalkungsherde eine größere Menge an Bakterien.

In einer Studie von Liebana und Mitarbeitern (2008) wird berichtet, dass häufig Granulome im Präparat eine große Fläche einnehmen und sie nur eine geringe Menge an säurefesten Stäbchen enthalten, was auch in den Proben der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte. Laut den Autoren könnte dieses Phänomen mit einer tatsächlich geringen Bakterienlast von Geweben bei natürlicher Infektion zusammenhängen. Außerdem können, nach eigenen Erfahrungen, bei der Durchführung der säurefesten Färbung Schwierigkeiten auftreten, vor allem beim Entfernen des Fuchsin aus dem Präparat (zu langes oder zu häufiges Eintauchen in HCl-Alkohol-Gemisch kann auch zu Entfärbung von Bakterien führen).

In 30 % (73/238) der Präparate, die für Tuberkulose typische histologische Veränderungen aufwiesen, konnten keine säurefesten Stäbchen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Anzahl der Bakterien im Gewebe so gering war, dass sie übersehen wurden oder in der Ebene des angefertigten Schnittes tatsächlich keine Bakterien lagen. Für die Ziehl-Neelsen-Färbung wurde außerdem von einer Nachweisgrenze von  $10^4$  Mykobakterien pro Objektträger berichtet (Ulrichs et al., 2005), unterhalb derer die Bakterien nicht mehr aufzufinden sind. Eine ähnliche Einschränkung wird vermutlich auch für modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbungen, wie die Fite-Faraco-Färbung, gelten. Des weiteren bereitet es Schwierigkeiten, säurefeste

Stäbchen in den Gewebeschnitten zu entdecken, wenn nur sehr wenige darin vorkommen. Sie sind sehr klein und können zwischen intensiv angefärbten Gewebeteilen leicht übersehen werden. Im Gegensatz dazu waren sie bei schwach angefärbtem Hintergrund gut zu erkennen, jedoch gestaltete sich dann die Lokalisierung innerhalb der Läsion als schwierig. Stark verkalktes Material ist häufig schwer zu schneiden, sodass in manchen Präparaten Stücke herausgebrochen oder Gewebeteile eingerissen und, durch das Aufziehen auf den Objektträger umgeklappt waren, mit der Konsequenz, dass diese Bereiche nicht sicher beurteilt werden konnten. Jedoch betraf dies in der Regel nur kleine Anteile des Präparats.

Trotz dieser Nachteile und möglicher Fehlerquellen kann die Fite-Faraco-Färbung als modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung ein hilfreiches Mittel in der Diagnostik der Rindertuberkulose sein, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit veranschaulichen. So konnten bei 83 % (70/84) der untersuchten Tiere in den für Tuberkulose typischen histopathologischen Veränderungen säurefeste Stäbchen nachgewiesen und damit als erste Hinweise auf das Vorliegen einer Tuberkulose gedeutet werden. In anderen Studien wird jedoch von geringeren Nachweisquoten der Ziehl-Neelsen-Färbung berichtet (Goel & Budhwar, 2007; Varello et al., 2008; Watrelot-Virieux et al., 2006).

Des weiteren ist die Färbung einfach und schnell im Labor durchführbar, ohne dass spezielle Geräte oder Ausrüstung benötigt werden. Außerdem liegen die Ergebnisse sehr schnell vor, wobei an dieser Stelle zu erwähnen ist, dass das systematische Durchmustern der einzelnen Präparate einige Zeit (zum Teil mehrere Stunden, je nach Größe der Läsion) in Anspruch nehmen kann und ein geschultes Auge erfordert. Jedoch darf der Nachweis säurefester Stäbchen im Gewebe nicht als Beweis für das Vorliegen einer Tuberkuloseinfektion angesehen werden, sondern der Verdacht ist stets durch einen bakteriologischen oder molekularbiologischen Nachweis des Erregers zu bestätigen.





## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Seit 2009 treten in Rinderbeständen Deutschlands wiederholt Fälle von Tuberkulose, verursacht durch *M. caprae*, auf. Von insgesamt 84 der betroffenen Tiere wurden Proben makroskopisch veränderter Organe und Lymphknoten für weitere Untersuchungen entnommen. Dabei handelte es sich um Dünndarm, Leber, Lunge, Mesenterial-, Portal-, Mediastinal- und Retropharyngeallymphknoten. Die makroskopischen Veränderungen stellten sich überwiegend als gelbliche, teils trockene, teils speckige Herde mit einem Durchmesser von bis zu 3 cm dar. Es traten sowohl multiple kleine Knoten, als auch singuläre größere Herde auf. Die Tiere waren alle klinisch unauffällig und befanden sich sehr wahrscheinlich in der Primärinfektionsperiode.

Für die histopathologische Untersuchung wurden aus den entnommenen Gewebeproben 238 Paraffinblöcke angefertigt, die mittels Hämalaun-Eosin- und einer Ziehl-Neelsen-Färbung modifiziert nach Fite-Faraco untersucht wurden.

Die Läsionen in den angefertigten Präparaten wurden detailliert beschrieben und anhand des Auftretens der verschiedenen Komponenten der granulomatösen Entzündung vom Tuberkulose-Typ (Epitheloid- und Riesenzellen vom LANGHANS-Typ, Lymphozyten, Plasmazellen, Nekrose, Verkalkung, fibröses Bindegewebe) und der Ausdehnung im Gewebe in Veränderungstypen 1 bis 4 eingeteilt, anhand derer die Verteilung und Lokalisation säurefester Stäbchen erfasst wurden.

Typ 1 stellt das klassische rundliche Granulom mit zentraler Nekrose und Verkalkung, umgeben von Epitheloid- und Riesenzellen, dar, auf die eine Zone mit Lymphozyten und Plasmazellen folgt, eingfasst von einer bindegewebigen Kapsel. Säurefeste Stäbchen liegen darin vor allem in der Nekrose. Bei Typ 2 findet sich eine unregelmäßig durch das Gewebe verlaufende, häufig breitflächige Nekrosezone mit teilweise multiplen Verkalkungsherden, umgeben von Epitheloid- und Riesenzellen, sowie Lymphozyten und Plasmazellen. Diese Veränderung tritt mit einem Anteil von 56 % der Präparate recht häufig auf. Säurefeste Stäbchen finden sich darin vor allem in der Nekrosezone, aber auch in Verkalkungen, Epitheloid- und Riesenzellen. Bei Typ 3a handelt es sich um Ansammlungen von Epitheloid- und Riesenzellen (Epitheloidzellgranulome), die mit 63 % der Präparate am häufigsten vorkommen. Säurefeste Stäbchen wurden hier in beiden Zellarten gefunden. Typ 3b liegen

Epitheloidzellgranulome zugrunde, wobei zusätzlich Nekrose, Verkalkungsherde und dünne Bindegewebskapseln auftreten. Unter Typ 4 fielen unterschiedliche histopathologische Bilder, die den anderen nicht eindeutig zuzuordnen waren.

Insgesamt konnte in 83 % der Fälle (70/84 Tiere) der Tuberkuloseverdacht mittels histopathologischer Untersuchung und Nachweis säurefester Stäbchen erhärtet werden. Bei 2 von 84 Tieren war das histologische Bild nicht eindeutig und es konnten mit der säurefesten Färbung keine Erreger nachgewiesen werden, sodass es sich hierbei vermutlich um eine granulomatöse Entzündung anderen Ursprungs handelte. Die übrigen 12 Tiere wiesen zwar histologisch tuberkulosetypische Veränderungen auf, jedoch waren keine säurefesten Stäbchen aufzufinden.

## 7 SUMMARY

Since 2009 cases of bovine tuberculosis, caused by *M. caprae*, repeatedly occur in german cattle flocks. Samples of organs and lymph nodes with gross lesions typical for tuberculosis were taken from 84 affected animals for further examination. The tissue samples were small intestine, liver, lung, mesenteric, mediastinal, retropharyngeal and hepatic lymph nodes. The macroscopic lesions appeared as yellow, partly dry, partly greasy foci with a maximum size of 3 cm in diameter. They presented as small multiple nodes or bigger singular foci. The animals did not show any clinical signs and were probably in the primary period of infection.

For histopathological examination 238 blocks of paraffin were made out of the tissue samples and investigated by the hemalaun eosin and a modified Ziehl-Neelsen staining (Fite Faraco).

The lesions were described in detail and divided into types 1 to 4 on basis of the occurrence of different components of granulomatous inflammation (epithelioid cells, multinucleated giant cells of the LANGHANS-type, lymphocytes, plasma cells, necrosis, mineralization, fibrous tissue) and the expansion in tissue and the distribution and localization of acid fast bacilli was registered in these types.

Type 1 represents the classical round granuloma with central necrosis and mineralization, surrounded by epithelioid and giant cells, followed by a zone of lymphocytes and plasma cells, enclosed by a capsule of fibrous tissue. In type 2 an irregular, usually large zone of necrosis with multiple foci of calcification can be found, surrounded by epithelioid and giant cells, lymphocytes and plasma cells. This lesion appears with 56 % of the slides quite frequent. Acid fast bacilli mainly appear in the necrosis, but also in the calcification, epithelioid and giant cells. Type 3a is composed of aggregations of epithelioid and giant cells (epithelioid cell granuloma) and with 63 % of the slides the most common form. Acid fast organisms were detected in both cell types.

The basis of type 3b is the epithelioid cell granuloma, supplemented by necrosis, foci of mineralization and a thin fibrous capsule. All histopathological pictures, that did not match with these four types, were summarized in type 4.

Altogether in 83 % of the cases (70/84) the suspicion of tuberculosis could be achieved by histopathological examination and detection of acid fast bacilli. In 2 of 84 animals

the histological picture was not definite and the detection of acid fast bacilli in the FF failed assuming another origin for the granulomatous inflammation. The other 12 animals showed histological lesions typical of tuberculosis, but acid fast organisms could not be found.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

### 8.1 Literatur

- Ackermann, M. R. (2009). Chronische Entzündung und Wundheilung. In McGavin, M. D. & Zachary, J. F. (Eds.), *Pathologie der Haustiere* (pp. 148-149)
- Adams, A. P., Bolin, S. R., Fine, A. E., Bolin, C. A., Kaneene, J. B. (2013). Comparison of PCR versus culture for detection of *Mycobacterium bovis* after experimental inoculation of various matrices held under environmental conditions for extended periods. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(20), 6501-6506.
- Agarwal, N., Lamichhane, G., Gupta, R., Nolan, S., Bishai, W. R. (2009). Cyclic AMP intoxication of macrophages by a *Mycobacterium tuberculosis* adenylate cyclase. *Nature*, 460(7251), 98-102.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Dominguez, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 6), 1785-1789.
- Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, J. C., Cousins, D., Ortega, A., Blazquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G., Dominguez, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(3), 1263-1273.
- Armstrong, J. A., Hart, P. D. (1975). Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *Journal of Experimental Medicine*, 142(1), 1-16.
- Asselineau, J., Lederer, E. (1950). Structure of the mycolic acids of *Mycobacteria*. *Nature*, 166(4227), 782-783.
- Astarie-Dequeker, C., Le Guyader, L., Malaga, W., Seaphanh, F. K., Chalut, C., Lopez, A., Guilhot, C. (2009). Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of

- plasma membrane lipids. PLoS Pathogens, 5(2), e1000289.
- Barry, C. E., 3rd, Mdluli, K. (1996). Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components. Trends in Microbiology, 4(7), 275-281.
- Battaglioli, T., Rintiswati, N., Martin, A., Palupi, K. R., Bernaerts, G., Dwihardiani, B., Ahmed, R. A., Matthys, F., Mahendradhata, Y., Van der Stuyft, P. (2013). Comparative performance of Thin Layer Agar and Lowenstein-Jensen culture for diagnosis of tuberculosis. Clinical Microbiology and Infection, 19(11), E502-508.
- Berg, J. W. (1953). The dual nature of acid-fastness. Yale Journal of Biology and Medicine, 26(3), 215-223.
- Bishop, P. J., Neumann, G. (1970). The history of the Ziehl-Neelsen stain. Tubercle, 51(2), 196-206.
- Boom, W. H., Canaday, D. H., Fulton, S. A., Gehring, A. J., Rojas, R. E., Torres, M. (2003). Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. Tuberculosis, 83(1-3), 98-106.
- Bos, K. I., Harkins, K. M., Herbig, A., Coscolla, M., Weber, N., Comas, I., Forrest, S. A., Bryant, J. M., Harris, S. R., Schuenemann, V. J., Campbell, J. T., Majander, K., Wilbur, A. K., Guichon, R. A., Wolfe Steadman, D. L., Cook, D. C., Niemann, S., Behr, M. A., Zumarraga, M., Bastida, R., Huson, D., Nieselt, K., Young, D., Parkhill, J., Buikstra, J. E., Gagneux, S., Stone, A. C., Krause, J. (2014). Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. Nature, 514(7523), 494-497.
- Boussiotis, V. A., Tsai, E. Y., Yunis, E. J., Thim, S., Delgado, J. C., Dascher, C. C., Berezovskaya, A., Rousset, D., Reynes, J. M., Goldfeld, A. E. (2000). IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. Journal of Clinical Investigation, 105(9), 1317-1325.
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 83T(1-3), 91-97.
- Brügger, H. (1950). Der Typus humanus und der Typus bovinus des Tuberkelbacillus bei Mensch und Tier. Lung, 104(1), 22-37.

- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. (2015). Tuberkulose der Rinder. Retrieved 27.04.2015, from [http://www.bmel.de/DE/Tier/Tiergesundheit/Tierseuchen/\\_texte/Rindertuberkulose.html](http://www.bmel.de/DE/Tier/Tiergesundheit/Tierseuchen/_texte/Rindertuberkulose.html)
- Carstensen, M., DonCarlos, M. W. (2011). Preventing the establishment of a wildlife disease reservoir: a case study of bovine tuberculosis in wild deer in Minnesota, USA. *Veterinary Medicine International*, 2011, 413240.
- Casal, C., Diez-Guerrier, A., Alvarez, J., Rodriguez-Campos, S., Mateos, A., Linscott, R., Martel, E., Lawrence, J. C., Whelan, C., Clarke, J., O'Brien, A., Dominguez, L., Aranaz, A. (2014). Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Veterinary Microbiology*, 170(3-4), 342-351.
- Cassidy, J. P. (2006). The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4), 151-161.
- Cassidy, J. P., Bryson, D. G., Pollock, J. M., Evans, R. T., Forster, F., Neill, S. D. (1998). Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Comparative Pathology*, 119(1), 27-44.
- Cassidy, J. P., Bryson, D. G., Pollock, J. M., Evans, R. T., Forster, F., Neill, S. D. (1999). Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. *Journal of Comparative Pathology*, 121(4), 321-337.
- Chan, J., Fan, X. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J., Bloom, B. R. (1991). Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infection and Immunity*, 59(5), 1755-1761.
- Claridge, J., Diggle, P., McCann, C. M., Mulcahy, G., Flynn, R., McNair, J., Strain, S., Welsh, M., Baylis, M., Williams, D. J. (2012). *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nature Communications*, 3(853).
- Cooper, A. M., Roberts, A. D., Rhoades, E. R., Callahan, J. E., Getzy, D. M., Orme, I. M. (1995). The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*, 84(3), 423-432.

- Corner, L. A. (1994). Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 40(1-2), 53-63.
- Cousins, D. V., Wilton, S. D., Francis, B. R. (1991). Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*, 27(2), 187-195.
- Daniel, T. M. (2015). Jean-Antoine Villemin and the infectious nature of tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 19(3), 267-268.
- Dannenbergh, A. M., Jr. (1991). Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology Today*, 12(7), 228-233.
- de Valliere, S., Abate, G., Blazevic, A., Heuertz, R. M., Hoft, D. F. (2005). Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infection and Immunity*, 73(10), 6711-6720.
- Ding, A. H., Nathan, C. F., Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology*, 141(7), 2407-2412.
- Dlugovitzky, D., Bay, M. L., Rateni, L., Fiorenza, G., Vietti, L., Farroni, M. A., Bottasso, O. A. (2000). Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clinical and Experimental Immunology*, 122(3), 343-349.
- Domingo, M., Vidal, E., Marco, A. (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97, S20-S29.
- Dormer, B. A., Martinaglia, G., Hobbs, W. B. (1961). INH prophylaxis and treatment in bovines. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 35, 429-431.
- Downing, J. F., Pasula, R., Wright, J. R., Twigg, H. L., 3rd, Martin, W. J., 2nd. (1995). Surfactant protein a promotes attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), 4848-4852.



- Dürrling, H. (1991). Abszeßartige Lymphknotenveränderungen beim Rind, ein Beitrag zur Differentialdiagnose der Rindertuberkulose, Mh. Monatshefte für Veterinärmedizin, 46, 54-56.
- Ehrlich, P. (1882). Aus dem Verein für innere Medizin zu Berlin—Sitzung vom 1 Mai. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 8, 269-270.
- Ernst, J. D. (1998). Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity, 66(4), 1277-1281.
- Evangelista, T. B. R., de Anda, J. H. (1996). Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium* spp. exposure associated with management of colostrum and milk. Preventive Veterinary Medicine, 27(1), 23-27.
- Flesch, I. E., Kaufmann, S. H. (1990). Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. Infection and Immunity, 58(8), 2675-2677.
- Flynn, J. L., Chan, J., Triebold, K. J., Dalton, D. K., Stewart, T. A., Bloom, B. R. (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Journal of Experimental Medicine, 178(6), 2249-2254.
- Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Chan, J., Triebold, K. J., Pfeffer, K., Lowenstein, C. J., Schreiber, R., Mak, T. W., Bloom, B. R. (1995). Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Immunity, 2(6), 561-572.
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffre, A., Sabio y Garcia, J., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A. A., Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Virulence, 4(1), 3-66.
- Francis, J. (1958). Tuberculosis in animals and man. A study in comparative pathology. London: Cassell & Co.
- Francis, J. (1972). Route of infection in tuberculosis. Australian Veterinary Journal, 48(10), 578.
- Frerking, H., Geyer, K., Rosenberger, G. (1995). Tuberkulose. In G. Assmus, H. Frerking, K. Geyer, A. Liebisch, A. Meermann, & G. Rosenberger (Eds.), Buiatrik Band II Rinderkrankheiten (5 ed., Vol. 2). Hannover: Schaper.

- Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,. (2013). Rindertuberkulose. Retrieved 27.04.2015, from [https://www.fli.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/Publikationen/FLI-Informationen/FLI-Information\\_Tuberkulose.pdf](https://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/FLI-Informationen/FLI-Information_Tuberkulose.pdf)
- Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, (2015). Amtliche Methodensammlung. Tuberkulose der Rinder (*M. bovis* und *M. caprae*). Retrieved 04.03.2016, from [https://openagrar.bmel-forschung.de/receive/openagrar\\_mods\\_00005698](https://openagrar.bmel-forschung.de/receive/openagrar_mods_00005698)
- Fritsche, A., Engel, R., Buhl, D., Zellweger, J. P. (2004). *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 8(7), 903-904.
- Garcia-Jimenez, W. L., Benitez-Medina, J. M., Fernandez-Llario, P., Abecia, J. A., Garcia-Sanchez, A., Martinez, R., Risco, D., Ortiz-Pelaez, A., Salguero, F. J., Smith, N. H., Gomez, L., (2013). Comparative pathology of the natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in wild boar (*Sus scrofa*). Transboundary and Emerging Diseases, 60(2), 102-109.
- Gavier-Widen, D., Chambers, M. A., Palmer, N., Newell, D. G., Hewinson, R. G., Hermoso de Mendoza, J. (2001). Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) and its relationship with bacterial excretion. The Veterinary Record, 148(10), 299-304.
- Gaynor, C. D., McCormack, F. X., Voelker, D. R., McGowan, S. E., Schlesinger, L. S. (1995). Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. Journal of Immunology, 155(11), 5343-5351.
- Goel, M. M., Budhwar, P. (2007). Immunohistochemical localization of *Mycobacterium tuberculosis* complex antigen with antibody to 38 kDa antigen versus Ziehl Neelsen staining in tissue granulomas of extrapulmonary tuberculosis. The Indian Journal of Tuberculosis, 54(1), 24-29.
- Goepfert, C., Regenscheit, N., Schumacher, V., Roos, S., Rossier, C., Baehler, C., Schmitt, S., Posthaus, H. (2014). *Mycobacterium avium* subsp. *avium* infection in four veal calves: differentiation from intestinal tuberculosis. Biomed Research International, 2014.
- Goren, M. B., D'Arcy Hart, P., Young, M. R., Armstrong, J. A. (1976). Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of

- Mycobacterium tuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 73(7), 2510-2514.
- Gormley, E., Corner, L. A., Costello, E., Rodriguez-Campos, S. (2014). Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. Research in Veterinary Science, 97 Suppl, S30-43.
- Grange, J. M., Yates, M. D. (1994). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Veterinary Microbiology, 40(1-2), 137-151.
- Griffith, A. S. (1937). Bovine tuberculosis in man. Tubercle, 18(12), 529-543.
- Gutierrez Cancela, M. M., Garcia Marin, J. F. (1993). Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. Journal of Comparative Pathology, 109(4), 361-370.
- Hein, W. R., Mackay, C. R. (1991). Prominence of  $\gamma\delta$  T cells in the ruminant immune system. Immunology Today, 12(1), 30-34.
- Hendry, C., Dionne, K., Hedgepeth, A., Carroll, K., Parrish, N. (2009). Evaluation of a rapid fluorescent staining method for detection of mycobacteria in clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology, 47(4), 1206-1208.
- Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., Besra, G. S., Lee, O. Y., Gernaey, A. M., Galili, E., Eshed, V., Greenblatt, C. L., Lemma, E., Bar-Gal, G. K., Spigelman, M. (2008). Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. PLoS One, 3(10), e3426.
- Herzog, H. (1998). History of tuberculosis. Respiration, 65(1), 5-15.
- Heym, B., Zhang, Y., Poulet, S., Young, D., Cole, S. T. (1993). Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology, 175(13), 4255-4259.
- Hippokrates. Epidemien. E-Book, from  
<https://ebooks.adelaide.edu.au/h/hippocrates/epidemics/index.html>

- Hirsch, C. S., Ellner, J. J., Russell, D. G., Rich, E. A. (1994). Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *Journal of Immunology*, 152(2), 743-753.
- Holani, A. G., Ganvir, S. M., Shah, N. N., Bansode, S. C., Shende, I., Jawade, R., Bijjargi, S. C. (2014). Demonstration of mycobacterium tuberculosis in sputum and saliva smears of tuberculosis patients using ziehl neelsen and flurochrome staining- a comparative study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(7), ZC42-45.
- Hosseini, H., Fooladi, A. A., Arjomandzadegan, M., Emami, N., Bornasi, H. (2014). Genetics study and transmission electron microscopy of pili in susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7S1, S199-203.
- Huard, R. C., Lazzarini, L. C., Butler, W. R., van Soolingen, D., Ho, J. L. (2003). PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1637-1650.
- Hübner, K. (1956). Entwicklung und Stand der Rindertuberkulosebekämpfung im europäischen Ausland. *Die Rindertuberkulose*, 5(5), 117-133.
- Huitema, H. (1969). The eradication of bovine tuberculosis in cattle in the Netherlands and the significance of man as a source of infection for cattle. *Selected papers of the Royal Netherlands Tuberculosis Association*, 12, 62-67.
- Hunter, R. L., Olsen, M., Jagannath, C., Actor, J. K. (2006). Trehalose 6,6'-dimycolate and lipid in the pathogenesis of caseating granulomas of tuberculosis in mice. *American Journal of Pathology*, 168(4), 1249-1261.
- Hunter, S. W., Gaylord, H., Brennan, P. J. (1986). Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *Journal of Biological Chemistry*, 261(26), 12345-12351.
- Indrigo, J., Hunter, R. L., Jr., Actor, J. K. (2003). Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology*, 149(Pt 8), 2049-2059.
- Jackson, M., Crick, D. C., Brennan, P. J. (2000). Phosphatidylinositol is an essential

- phospholipid of mycobacteria. Journal of Biological Chemistry, 275(39), 30092-30099.
- Jackson, R., Cooke, M. M., Coleman, J. D., Morris, R. S., de Lisle, G. W., Yates, G. F. (1995). Naturally occurring tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*): III. Routes of infection and excretion. New Zealand Veterinary Journal, 43(7), 322-327.
- Jang, M. H., Kim, S. Y., Kim, C. K., Hwang, S. H., Park, B. K., Kim, S. S., Lee, E. Y., Chang, C. L. (2014). Early detection of mycobacteria using a novel hydrogel culture method. Annals of Laboratory Medicine, 34(1), 26-30.
- Januschke, E. (1928). Die Tuberkulose des Rindes. Berlin und Wien: Urban & Schwarzenberg.
- Kanai, K., Kondo, E., Yasuda, T. (1981). An electron microscopy study of intra-cellular mycobacteria in experimental mouse tuberculosis. Tubercle, 62(3), 187-195.
- Kappelman, J., Alçiçek, M. C., Kazancı, N., Schultz, M., Özkul, M., Şen, Ş. (2008). First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. American Journal of Physical Anthropology, 135(1), 110-116.
- Kleeberg, H. H. (1963). Eradication of bovine tuberculosis. Journal of the South African Veterinary Medical Association, 34(3), 393-400.
- Koch, R. (1882). Die Ätiologie der Tuberkulose. Berliner klinische Wochenschrift, 19, 428-445.
- Ladel, C. H., Szalay, G., Riedel, D., Kaufmann, S. H. (1997). Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. Infection and Immunity, 65(5), 1936-1938.
- Laisse, C. J., Gavier-Widen, D., Ramis, G., Bila, C. G., Machado, A., Quereda, J. J., Agren, E. O., van Helden, P. D. (2011). Characterization of tuberculous lesions in naturally infected African buffalo (*Syncerus caffer*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 23(5), 1022-1027.
- Langmuir, A. D. (1961). Epidemiology of airborne infection. Bacteriological reviews, 25, 173-181.
- Lehmann, K., Neumann, R. (1896). Atlas und Grundriss der Bakteriologie und

- Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. München: Lehmann.
- Leipig, M., Naumann, L., Schramme, C., Hermanns, W. (2009). Ausbruch boviner Tuberkulose verursacht durch *Mycobacterium caprae* im Unterallgäu. Sonderdruck Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, 16(3), 1-4.
- Lepper, A. W., Pearson, C. W., Outteridge, P. M. (1973). Assessment of the bentonite flocculation test for detecting tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 49(10), 445-450.
- Liebana, E., Aranaz, A., Aldwell, F. E., McNair, J., Neill, S. D., Smyth, A. J., Pollock, J. M. (2000). Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunology*, 99(1), 23-29.
- Liebana, E., Johnson, L., Gough, J., Durr, P., Jahans, K., Clifton-Hadley, R., Spencer, Y., Hewinson, R. G., Downs, S. H. (2008). Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *Veterinary Journal*, 176(3), 354-360.
- Marten, B. (1720). A new theory of consumptions: more especially of a phthisis or consumption of the lungs. London: R. Knaplock.
- Martinez, F. O., Helming, L., Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, 27, 451-483.
- Maxie, M., Jubb, K., Kennedy, P., Palmer, N. (2007). Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. In M. Maxie (Ed.), (5 ed., Vol. 2): Saunders Elsevier.
- McDonough, K. A., Kress, Y., Bloom, B. R. (1993). Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infection and Immunity*, 61(7), 2763-2773.
- McIlroy, S. G., Neill, S. D., McCracken, R. M. (1986). Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *The Veterinary Record*, 118(26), 718-721.
- Menin, A., Fleith, R., Reck, C., Marlow, M., Fernandes, P., Pilati, C., Bafica, A. (2013). Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *PLoS One*, 8(1),

e53884.

Monaghan, M., Doherty, M., Collins, J., Kazda, J., Quinn, P. (1994). The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, 40(1), 111-124.

Neelsen, F. (1883). Ein casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. *Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften*, 21, 497-501.

Neill, S. D., Hanna, J., Mackie, D. P., Bryson, T. G. (1992). Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *The Veterinary Record*, 131(3), 45-47.

Neill, S. D., Hanna, J., O'Brien, J. J., McCracken, R. M. (1988a). Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *The Veterinary Record*, 123(13), 340-343.

Neill, S. D., Hanna, J., O'Brien, J. J., McCracken, R. M. (1989). Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. *The Veterinary Record*, 124(11), 269-271.

Neill, S. D., O'Brien, J. J., McCracken, R. M. (1988b). *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *The Veterinary Record*, 122(8), 184-186.

Neill, S. D., Pollock, J. M., Bryson, D. B., Hanna, J. (1994). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 40(1-2), 41-52.

Nerlich, A. G., Haas, C. J., Zink, A., Szeimies, U., Hagedorn, H. G. (1997). Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet*, 350(9088), 1404.

Ng, V. H., Cox, J. S., Sousa, A. O., MacMicking, J. D., McKinney, J. D. (2004). Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Molecular Microbiology*, 52(5), 1291-1302.

Nieberle, K. (1938). *Tuberkulose und Fleischhygiene*. Stuttgart: G. Fischer Verlag.

Niemann, S., Richter, E., Rusch-Gerdes, S. (2002). Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists

- 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52(Pt 2), 433-436.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science, 264(5157), 382-388.
- OIE. (2009). Bovine Tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter 2.4.7. (Vol. 2).
- Öztürk, H. (in Vorbereitung). Tuberculosis in cattle (*M. caprae*) in the years 2009 – 2014: pathomorphology and histological demonstration of mycobacteria in bovine tuberculosis. Dissertation.
- Pallaske, G. (1961). Pathologische Anatomie und Pathogenese der spontanen Tuberkulose der Tiere. Stuttgart: G. Fischer Verlag.
- Palmer, M. V., Waters, W. R., Thacker, T. C. (2007). Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. Veterinary Pathology, 44(6), 863-874.
- Palmer, M. V., Whipple, D. L., Rhyan, J. C., Bolin, C. A., Saari, D. A. (1999). Granuloma development in cattle after intratonsillar inoculation with *Mycobacterium bovis*. American Journal of Veterinary Research, 60(3), 310-315.
- Piddington, D. L., Fang, F. C., Laessig, T., Cooper, A. M., Orme, I. M., Buchmeier, N. A. (2001). Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. Infection and Immunity, 69(8), 4980-4987.
- Pirson, C., Engel, R., Jones, G. J., Holder, T., Holst, O., Vordermeier, H. M. (2015). Highly purified mycobacterial phosphatidylinositol mannosides drive cell-mediated responses and activate NKT cells in cattle. Clinical and Vaccine Immunology, 22(2), 178-184.
- Plackett, P., Ripper, J., Corner, L. A., Small, K., de Witte, K., Melville, L., Hides, S., Wood, P. R. (1989). An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. Australian Veterinary Journal, 66(1), 15-19.
- Pollock, J., McNair, J., Welsh, M., Girvin, R., Kennedy, H., Mackie, D., Neill, S. D. (2001). Immune responses in bovine tuberculosis. Tuberculosis, 81(1), 103-107.



- Pollock, J. M., Neill, S. D. (2002). *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary Journal*, 163(2), 115-127.
- Pritchard, D. G. (1988). A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *Journal of Comparative Pathology*, 99(4), 357-399.
- Pugin, J., Heumann, I. D., Tomasz, A., Kravchenko, V. V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., Glauser, M. P., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. (1994). CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*, 1(6), 509-516.
- Puissegur, M. P., Botanch, C., Duteyrat, J. L., Delsol, G., Caratero, C., Altare, F. (2004). An in vitro dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cellular Microbiology*, 6(5), 423-433.
- Puissegur, M. P., Lay, G., Gilleron, M., Botella, L., Nigou, J., Marrakchi, H., Mari, B., Duteyrat, J. L., Guerardel, Y., Kremer, L., Barbry, P., Puzo, G., Altare, F. (2007). Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a TLR2-dependent, ADAM9- and beta1 integrin-mediated pathway. *Journal of Immunology*, 178(5), 3161-3169.
- Purohit, M. R., Mustafa, T., Wiker, H. G., Morkve, O., Sviland, L. (2007). Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen MPT64. *Diagnostic Pathology*, 2, 36.
- Reddington, K., O'Grady, J., Dorai-Raj, S., Niemann, S., van Soolingen, D., Barry, T. (2011). A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. *PLoS One*, 6(8), e23481.
- Reja, A. H., Biswas, N., Biswas, S., Dasgupta, S., Chowdhury, I. H., Banerjee, S., Chakraborty, T., Dutta, T. K., Bhattacharya, B. (2013). Fite-Faraco staining in combination with multiplex polymerase chain reaction: a new approach to leprosy diagnosis. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 79(5), 693-700.
- Rhodes, S. G., Palmer, N., Graham, S. P., Bianco, A. E., Hewinson, R. G., Vordermeier, H. M. (2000). Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*, 68(9), 5393-5400.
- Ritacco, V., Lopez, B., De Kantor, I. N., Barrera, L., Errico, F., Nader, A. (1991). Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 50(3), 365-367.

- Robbe-Austerman, S., Bravo, D. M., Harris, B. (2013). Comparison of the MGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens. BMC Veterinary Research, 9, 74.
- Rodriguez-Nunez, J., Avelar, F. J., Marquez, F., Rivas-Santiago, B., Quinones, C., Guerrero-Barrera, A. L. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* complex detected by modified fluorescent in situ hybridization in lymph nodes of clinical samples. Journal of Infection in Developing Countries, 6(1), 58-66.
- Romagnani, S. (1996). Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection. Trends in Microbiology, 4(12), 470-473.
- Rothel, J. S., Jones, S. L., Corner, L. A., Cox, J. C., Wood, P. R. (1990). A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Australian Veterinary Journal, 67(4), 134-137.
- Rothel, J. S., Jones, S. L., Corner, L. A., Cox, J. C., Wood, P. R. (1992). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. Australian Veterinary Journal, 69(1), 1-4.
- Rothschild, B. M., Martin, L. D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G. K., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spigelman, M., Brittain, D. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. Clinical Infectious Diseases, 33(3), 305-311.
- Ryan, T. J., Buddle, B. M., De Lisle, G. W. (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. Research in Veterinary Science, 69(1), 57-61.
- Sakamoto, K. (2012). The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Veterinary Pathology, 49(3), 423-439.
- Sakamoto, K., Kim, M. J., Rhoades, E. R., Allavena, R. E., Ehrt, S., Wainwright, H. C., Russell, D. G., Rohde, K. H. (2013). Mycobacterial trehalose dimycolate reprograms macrophage global gene expression and activates matrix metalloproteinases. Infection and Immunity, 81(3), 764-776.
- Schlesinger, L. S. (1993). Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. Journal of Immunology, 150(7), 2920-2930.

- Schlesinger, L. S., Bellinger-Kawahara, C. G., Payne, N. R., Horwitz, M. A. (1990). Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *Journal of Immunology*, 144(7), 2771-2780.
- Schlesinger, L. S., Hull, S. R., Kaufman, T. M. (1994). Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *Journal of Immunology*, 152(8), 4070-4079.
- Schlesinger, L. S., Kaufman, T. M., Iyer, S., Hull, S. R., Marchiando, L. K. (1996). Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *Journal of Immunology*, 157(10), 4568-4575.
- Schliesser, T. (1982). Die Rindertuberkulose im Wandel der letzten 100 Jahre (1882-1982). *Praxis und Klinik der Pneumologie*, 36, 151-156.
- Schluger, N. W., Rom, W. N. (1998). The host immune response to tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(3 Pt 1), 679-691.
- Silva, E. (2001). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 78(2), 111-117.
- Spargo, B. J., Crowe, L. M., Ioned, T., Beaman, B. L., Crowe, J. H. (1991). Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(3), 737-740.
- Stamp, J. (1948). Bovine pulmonary tuberculosis. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 58(1), 9-23.
- Stender, H., Lund, K., Petersen, K. H., Rasmussen, O. F., Hongmanee, P., Miorner, H., Godtfredsen, S. E. (1999a). Fluorescence In situ hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 2760-2765.
- Stender, H., Mollerup, T. A., Lund, K., Petersen, K. H., Hongmanee, P., Godtfredsen, S. E. (1999b). Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in

- smear-positive sputum samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3(9), 830-837.
- Stenger, S., Mazzaccaro, R. J., Uyemura, K., Cho, S., Barnes, P. F., Rosat, J. P., Sette, A., Brenner, M. B., Porcelli, S. A., Bloom, B. R., Modlin, R. L. (1997). Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*, 276(5319), 1684-1687.
- Takade, A., Umeda, A., Matsuoka, M., Yoshida, S., Nakamura, M., Amako, K. (2003). Comparative studies of the cell structures of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* using the electron microscopy freeze-substitution technique. *Microbiology and Immunology*, 47(4), 265-270.
- Tenner, A. J., Robinson, S. L., Borchelt, J., Wright, J. R. (1989). Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(23), 13923-13928.
- Thoen, C., Hall, M., Tannis, A., Petersburg, B., Harrington Jr, R. (1984). *Detection of mycobacterial antibodies in sera of cattle experimentally exposed to Mycobacterium bovis by use of a modified enzyme-linked immunosorbent assay*. Paper presented at the Proceedings of Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians.
- Toossi, Z., Ellner, J. J. (1998). Host response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library*, 3, 133-140.
- Torrado, E., Robinson, R. T., Cooper, A. M. (2011). Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends in Immunology*, 32(2), 66-72.
- Trautwein, G. (2006). Tuberkulose. In G. Dirksen, H.-D. Gründer, M. Stöber (Eds.), *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes* (5 ed.). Stuttgart: Parey
- Ulrichs, T., Lefmann, M., Reich, M., Morawietz, L., Roth, A., Brinkmann, V., Kosmiadi, G. A., Seiler, P., Aichele, P., Hahn, H., Krenn, V., Gobel, U. B., Kaufmann, S. H. (2005). Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. *Journal of Pathology*, 205(5), 633-640.
- v. Ostertag, R. (1928). Über die Bekämpfung der Tierseuchen. *Naturwissenschaften*, 16(45), 861-868.

- Valentin-Weigand, P. (2011). Mykobakterien. In M. Rolle & A. Mayr (Eds.), *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre* (9 ed., pp. 308-318). Stuttgart: Enke Verlag.
- Varello, K., Pezzolato, M., Mascarino, D., Ingravalle, F., Caramelli, M., Bozzetta, E. (2008). Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(2), 164-169.
- Via, L. E., Deretic, D., Ulmer, R. J., Hibler, N. S., Huber, L. A., Deretic, V. (1997). Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13326-13331.
- Wang, J., Zhou, X., Pan, B., Yang, L., Yin, X., Xu, B., Zhao, D. (2013). Investigation of the effect of *Mycobacterium bovis* infection on bovine neutrophils functions. *Tuberculosis (Edinb)*, 93(6), 675-687.
- Wangoo, A., Johnson, L., Gough, J., Ackbar, R., Inglut, S., Hicks, D., Spencer, Y., Hewinson, G., Vordermeier, M. (2005). Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *Journal of Comparative Pathology*, 133(4), 223-234.
- Wards, B. J., Collins, D. M., de Lisle, G. W. (1995). Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 43(2-3), 227-240.
- Waters, W. R., Buddle, B. M., Vordermeier, H. M., Gormley, E., Palmer, M. V., Thacker, T. C., Bannantine, J. P., Stabel, J. R., Linscott, R., Martel, E., Milian, F., Foshaug, W., Lawrence, J. C. (2011). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(11), 1882-1888.
- WatreLOT-Virieux, D., Drevon-Gaillot, E., Toussaint, Y., Belli, P. (2006). Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53(7), 321-325.
- Weber, A., Lutz, H., Bauer, K. (1988). Die derzeitige Bedeutung des Menschen für das Auftreten von *Mycobacterium bovis*-Infektionen in Rinderbeständen. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 101, 341-344.

- Welsh, M. D., Cunningham, R. T., Corbett, D. M., Girvin, R. M., McNair, J., Skuce, R. A., Bryson, D. G., Pollock, J. M. (2005). Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, 114(1), 101-111.
- Wengenack, N. L., Jensen, M. P., Rusnak, F., Stern, M. K. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a peroxynitritase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256(3), 485-487.
- Whipple, D. L., Bolin, C. A., Miller, J. M. (1996). Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(3), 351-354.
- Witchell, J., Maddipatla, S. V., Wangoo, A., Vordermeier, M., Goyal, M. (2010). Time dependent expression of cytokines in *Mycobacterium bovis* infected cattle lymph nodes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 138(1-2), 79-84.
- Wood, P. R., Corner, L. A., Rothel, J. S., Baldock, C., Jones, S. L., Cousins, D. B., McCormick, B. S., Francis, B. R., Creeper, J., Tweddle, N. E. (1991). Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 68(9), 286-290.
- Wood, P. R., Corner, L. A., Rothel, J. S., Ripper, J. L., Fifis, T., McCormick, B. S., Francis, B., Melville, L., Small, K., de Witte, Tolson, J., Ryan, T. J., de Lisle, G. W., Cox, J. C., Jones, S. L. (1992). A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 31(1), 71-79.
- Wood, P. R., Ripper, J., Radford, A. J., Bundesen, P. G., Rylatt, D. B., Cottis, L. E., John, M., Plackett, P. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Mycobacterium bovis*. *Journal of General Microbiology*, 134(9), 2599-2604.
- Wood, P. R., Rothel, J. S. (1994). In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 40(1-2), 125-135.
- World Health Organisation (WHO). (2015). Tuberculosis. Retrieved 27.04.2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
- Yamada, H., Chikamatsu, K., Aono, A., Mitarai, S. (2014). Pre-fixation of virulent *Mycobacterium tuberculosis* with glutaraldehyde preserves exquisite ultrastructure on transmission electron microscopy through cryofixation and freeze-substitution with osmium-acetone at ultralow temperature. *Journal of*

Microbiological Methods, 96, 50-55.

Yamada, H., Mitarai, S., Chikamatsu, K., Mizuno, K., Yamaguchi, M. (2010). Novel freeze-substitution electron microscopy provides new aspects of virulent *Mycobacterium tuberculosis* with visualization of the outer membrane and satisfying biosafety requirements. *Journal of Microbiological Methods*, 80(1), 14-18.

Zachary, J. F., McGavin, M. D. (2012). *Pathologic basis of veterinary disease* (5 ed.): Elsevier Health Sciences.

Zarden, C. F., Marassi, C. D., Carvalho, A. C., Figueiredo, E. E., Lilenbaum, W. (2013). Bacteriological and molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle with inconclusive results to intradermal tuberculin tests. *Epidemiology and Infection*, 141(7), 1390-1393.

Zerbi, P., Schonau, A., Bonetto, S., Gori, A., Costanzi, G., Duca, P., Vago, L. (2001). Amplified in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous *Mycobacterium* species on formalin-fixed, paraffin-embedded archival biopsy and autopsy samples. *American Journal of Clinical Pathology*, 116(5), 770-775.

Zhang, L., Goren, M. B., Holzer, T. J., Andersen, B. R. (1988). Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid I on human phagocytic cells. *Infection and Immunity*, 56(11), 2876-2883.

Ziehl, F. (1882). Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 8(33), 451.

Zimmerman, M. R. (1979). Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 55(6), 604-608.

## **8.2 Gesetze, Verordnungen und Richtlinien**

### **8.2.1 Gesetze und Verordnungen**

Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (Tuberkulose-Verordnung) vom 12. Juli 2013, zuletzt geändert durch Art. 16 V.v. 17.04.2014/388

### **8.2.2 EU-Richtlinien und -Verordnungen**

Entscheidung der Kommission vom 23. Juni 2003 zur Feststellung des amtlich anerkannt tuberkulose-, brucellose- und rinderleukosefreien Status bestimmter Mitgliedsstaaten und Regionen von Mitgliedsstaaten in Bezug auf die Rinderbestände (2003/467/EG), Amtsblatt der Europäischen Union L (156):74

Entscheidung der Kommission vom 15. Juli 1999 über die amtliche Anerkennung der Tuberkulosefreiheit von Rinderbeständen in bestimmten Mitgliedsstaaten und Regionen der Mitgliedsstaaten und zur Aufhebung der Entscheidung 97/76/EG (1999/467/EG), Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L (181):36

Entscheidung der Kommission vom 17. Dezember 1996 über Kontrollmethoden zur Aufrechterhaltung des amtlich anerkannt tuberkulosefreien Status von Rinderbeständen in bestimmten Mitgliedsstaaten und Regionen der Mitgliedsstaaten (97/76/EG), Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L (19):34

Richtlinie des Rates vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen (64/432/EWG), Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L (121):64

Verordnung der Kommission vom 8. Juli 2002 zur Änderung von Anhang B der Richtlinie 64/432/EWG des Rates (1226/2002/EG), Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L (179):13



## 9 ANHANG

### 9.1 Tabellen

**Tabelle 13:** Tagebuchnummer der einzelnen Tiere, Proben, Veränderungstyp und Ergebnisse der säurefesten Färbung nach Fite-Faraco

<b>Tgb.-Nr.</b>	<b>Organ</b>	<b>Veränderungstyp</b>	<b>Färbung nach Fite-Faraco</b>
E 96/09	Mesenteriallymphknoten	2, 3a, 3b	+
E 97/09	Mesenteriallymphknoten	2	+
E 98/09	Mesenteriallymphknoten	2, 3a, 3b	+
E 100/09	Mediastinallymphknoten	1	+
	Portallymphknoten	3a, 4	+
E 102/09	Dünndarm	1	+
	Mesenteriallymphknoten 1	1, 2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2	–
E 106/09	Mesenteriallymphknoten	2	+
E 107/09	Mediastinallymphknoten	2, 3a	+
E 108/09	Mediastinallymphknoten 1	2	+
	Mediastinallymphknoten 2	3a, 3b	+
	Mediastinallymphknoten 3	2	+
	Mesenteriallymphknoten 1	1, 2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 3	2	+
	Mesenteriallymphknoten 4	3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 5	2, 3a	–
E 110/09	Leber 1	1	–
	Leber 2	1	–
	Leber 3	1	+
	Leber 4	1	–
	Portallymphknoten 1	1, 2, 3b	+
	Portallymphknoten 2	1, 2, 3b	+
	Portallymphknoten 3	2, 3a, 3b	+
	Portallymphknoten 4	1, 2	–

<b>Tgb.-Nr.</b>	<b>Organ</b>	<b>Veränderungstyp</b>	<b>Färbung nach Fite-Faraco</b>
	Lunge	1	–
	Mediastinallymphknoten 1	1	+
	Mediastinallymphknoten 2	1, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 1	2	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	–
E 112/09	Portallymphknoten	1	+
	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3b	+
E 113/09	Mesenteriallymphknoten	1, 3a, 3b	+
E 114/09	Mesenteriallymphknoten 1	1, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 2	3a, 4	–
	Mesenteriallymphknoten 3	1, 3a	–
E 312/09	Mesenteriallymphknoten	2	+
E 313/09	Portallymphknoten	1	+
	Mesenteriallymphknoten	1	–
E 316/09	Mesenteriallymphknoten	1	+
E 317/09	Portallymphknoten	2, 3a	+
	Mediastinallymphknoten	2, 3b	+
	Lunge	3a	–
	Leber	1	–
	Mesenteriallymphknoten 1	2	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2	+
E 320/09	Mesenteriallymphknoten 1	3a, 3b	–
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3b	+
E 321/09	Mediastinallymphknoten	1, 3b	+
E 322/09	Lunge 1	1, 3a, 3b	–
	Lunge 2	1, 3a, 3b	+
	Lunge 3	2	+
	Lunge 4	2	–
	Mediastinallymphknoten	2	+
	Leber	4	–
	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2	+

<b>Tgb.-Nr.</b>	<b>Organ</b>	<b>Veränderungstyp</b>	<b>Färbung nach Fite-Faraco</b>
	Mesenteriallymphknoten 3	2, 3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 4	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 5	3a	–
	Mesenteriallymphknoten 6	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 7	2, 3a	+
	Portallymphknoten	1, 2, 3a	+
E 323/09	Lunge	1, 2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten	2	+
E 324/09	Leber/Peritoneum	3a, 3b	+
E 325/09	Leber	1	+
	Portallymphknoten	1, 2, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten	2, 3a, 3b	+
E 326/09	Mesenteriallymphknoten	2	+
S 1224/12	Lunge	1, 2, 3a, 3b	+
S 1256/12	Lunge 1	2, 3a, 3b	+
	Lunge 2	1, 2, 3a	+
	Mediastinallymphknoten 1	1, 2, 3a	+
	Mediastinallymphknoten 2	1, 3a	+
	Mediastinallymphknoten 3	1, 3a	+
S 1257/12	Mesenteriallymphknoten	2, 3a, 3b	+
S 1258/12	Mesenteriallymphknoten	2, 3a	+
S 1259/12	Retropharyngeallymphknoten	2, 3a, 3b	+
S 1260/12	Mesenteriallymphknoten	1	+
S 126/13	Mediastinallymphknoten 1	3a	+
	Mediastinallymphknoten 2	3a	+
	Mediastinallymphknoten 3	2, 3a, 3b	+
S 127/13	Mediastinallymphknoten	3a, 3b	+
S 128/13	Mesenteriallymphknoten	2, 3a, 3b	+
S 173/13	Mediastinallymphknoten	3a	+
S 175/13	Retropharyngeallymphknoten 1	1	–
	Retropharyngeallymphknoten 2	1	+
S 179/13	Mesenteriallymphknoten	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten	2, 3a	+

<b>Tgb.-Nr.</b>	<b>Organ</b>	<b>Veränderungstyp</b>	<b>Färbung nach Fite-Faraco</b>
S 183/13	Portallymphknoten	2, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 3	1, 2, 3a	+
S 292/13	Mesenteriallymphknoten 1	1, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	1, 2	+
S 293/13	Portallymphknoten	1, 3a	+
S 294/13	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 3	1, 2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 4	2	+
	Mesenteriallymphknoten 5	2	+
	Portallymphknoten	1, 3a, 3b	+
S 295/13	Mesenteriallymphknoten 1	1, 3a, 3b	–
	Mesenteriallymphknoten 2	1, 3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 3	2, 3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 4	2, 3a, 3b	+
	Portallymphknoten	1, 3a	–
S 298/13	Mesenteriallymphknoten 1	1, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 2	1, 3a	–
S 299/13	Mesenteriallymphknoten 1	1, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	+
	Retropharyngeallymphknoten 1	1, 2, 3a	+
	Retropharyngeallymphknoten 2	2, 3a	+
	Retropharyngeallymphknoten 3	1	+
S 300/13	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 3	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 4	2	+
S 605/13	Lunge 1	1, 3a	+
	Lunge 2	2	–
	Lunge 3	1, 3b	+
	Lunge 4	1, 3a	+

<b>Tgb.-Nr.</b>	<b>Organ</b>	<b>Veränderungstyp</b>	<b>Färbung nach Fite-Faraco</b>
	Lunge 5	1, 3a, 3b	+
	Mediastinallymphknoten 1	1, 2, 3a	+
	Mediastinallymphknoten 2	2, 3a, 3b	+
	Mediastinallymphknoten 3	1	+
	Mediastinallymphknoten 4	1, 3a	+
	Mediastinallymphknoten 5	1	+
	Mediastinallymphknoten 6	1	+
S 607/13	Lunge	3a	+
	Mediastinallymphknoten	2, 3a	+
S 770/13	Lunge 1	1, 2	+
	Lunge 2	1, 2	+
	Lunge 3	1, 3a, 3b	+
	Mediastinallymphknoten 1	2	+
	Mediastinallymphknoten 2	2	+
	Mediastinallymphknoten 3	1, 3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 1	2	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2	+
	Mesenteriallymphknoten 3	2	+
S 776/13	Mesenteriallymphknoten	4	–
	Retropharyngeallymphknoten 1	3b	–
	Retropharyngeallymphknoten 2	1, 3a, 3b	–
S 778/13	Retropharyngeallymphknoten 1	1	–
	Retropharyngeallymphknoten 2	1, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2	–
	Mesenteriallymphknoten 3	2	+
S 779/13	Mediastinallymphknoten 1	1, 3a	–
	Mediastinallymphknoten 2	2, 3b	+
S 780/13	Mediastinallymphknoten 1	1, 3a	–
	Mediastinallymphknoten 2	1, 3a, 3b	–
S 782/13	Mediastinallymphknoten	3a	+
S 783/13	Mesenteriallymphknoten	2	+
S 785/13	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a, 3b	+

<b>Tgb.-Nr.</b>	<b>Organ</b>	<b>Veränderungstyp</b>	<b>Färbung nach Fite-Faraco</b>
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	+
S 789/13	Mediastinallymphknoten 1	1, 3b	–
	Mediastinallymphknoten 2	2, 3a	–
S 1200/13	Mediastinallymphknoten 1	1, 2, 3a, 3b	+
	Mediastinallymphknoten 2	1, 2, 3a, 3b	+
	Mediastinallymphknoten 3	1, 2, 3a, 3b	+
S 1202/13	Mediastinallymphknoten 1	1, 3a, 3b	+
	Mediastinallymphknoten 2	1	+
S 1204/13	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2	+
S 1205/13	Mesenteriallymphknoten 1	2	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2	+
S 1207	Mesenteriallymphknoten	4	–
S 409/14	Retropharyngeallymphknoten 1	1, 2, 3a	+
	Retropharyngeallymphknoten 2	2, 3a, 3b	+
	Retropharyngeallymphknoten 3	1, 3a, 3b	+
	Retropharyngeallymphknoten 4	1, 3a	+
S 410/14	Mesenteriallymphknoten 1	1, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 2	2	–
S 411/14	Mesenteriallymphknoten	2, 3a	–
S 412/14	Mesenteriallymphknoten 1	1, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 3	1, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 4	2	+
S 413/14	Mesenteriallymphknoten 1	1, 2	+
	Mesenteriallymphknoten 2	1, 2	+
	Mesenteriallymphknoten 3	1, 2	+
	Mesenteriallymphknoten 4	1, 2, 3a	–
S 414/14	Mesenteriallymphknoten 1	1, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 2	1, 3a, 3b	–
S 415/14	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2	+
	Mesenteriallymphknoten 3	1, 2, 3a	+

<b>Tgb.-Nr.</b>	<b>Organ</b>	<b>Veränderungstyp</b>	<b>Färbung nach Fite-Faraco</b>
S 416/14	Mesenteriallymphknoten 1	3a, 3b	–
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 3	2, 3a	–
S 418/14	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	+
S 419/14	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 3	2, 3a, 3b	–
S 422/14	Lunge 1	1	–
	Lunge 2	1, 3a, 3b	–
	Lunge 3	1, 3a	+
	Lunge 4	1	–
	Lunge 5	1, 3a	–
	Lunge 6	1	–
S 423/14	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 3	2, 3a	+
S 425/14	Mesenteriallymphknoten 1	3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	–
S 426/14	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a, 3b	+
S 594/14	Mesenteriallymphknoten	3a, 3b	–
S 598/14	Mesenteriallymphknoten 1	1, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 2	1	–
	Mesenteriallymphknoten 3	1, 2	–
S 599/14	Mesenteriallymphknoten 1	3a, 3b	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a, 3b	+
S 600/14	Mesenteriallymphknoten	4	–
	Lunge 1	1	–
	Lunge 2	1, 3a, 3b	+
	Lunge 3	1, 3a, 3b	+
	Lunge 4	1, 3a, 3b	+
S 602/14	Mesenteriallymphknoten 1	3a, 3b	+

<b>Tgb.-Nr.</b>	<b>Organ</b>	<b>Veränderungstyp</b>	<b>Färbung nach Fite-Faraco</b>
	Mesenteriallymphknoten 2	3a, 3b	–
S 606/14	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	+
S 607/14	Mesenteriallymphknoten 1	3a	–
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	+
S 611/14	Mesenteriallymphknoten	2	+
S 612/14	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a	+
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a	–
	Mesenteriallymphknoten 3	3a, 3b	–
S 1067/14	Mesenteriallymphknoten 1	3a	–
	Mesenteriallymphknoten 2	3a	–
	Mesenteriallymphknoten 3	1, 3a	–
S 1068/14	Mesenteriallymphknoten 1	2, 3a, 3b	–
	Mesenteriallymphknoten 2	2, 3a, 3b	–



## **9.2 Lösungen zur Fixierung der Proben**

### **9.2.1 Klotz-Lösung**

- 500 g Natriumchlorid
- 1100 g Natriumsulfat
- 900 g Natriumbicarbonat
- 1000 g Chloralhydrat
- 1000 ml Formaldehyd (40%-ig)
- ad 90 l Aqua dest.

## **9.3 Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte**

### **9.3.1 Hämalaun-Eosin-Färbung**

#### **9.3.1.1 Eosin-Lösung**

- Erhitzen von 1000 ml Aqua dest.
- dann 10 g Eosin G (Carl Roth, Karlsruhe, Nr. 7089) in diesem Aqua dest. lösen
- anschließend 1,5 ml 96%-igen Eisessig (Merck, Darmstadt, Nr. 100063) in die Lösung filtrieren

#### **9.3.1.2 0,5%-ige HCl-Alkohol-Gebrauchslösung**

- 100 ml HCl-Alkohol-Stammlösung (Anhang 3.3.1)
- 100 ml 70%-iger Alkohol

### **9.3.2 Lösungen zur Vorbereitung für die FF**

#### **9.3.2.1 Xylol-Paraffinöl**

- 300 ml Paraffinöl
- 600 ml Xylol

- beides miteinander vermischen

### **9.3.3 Fite-Faraco-Färbung**

#### **9.3.3.1 1%-ige HCl-Alkohol-Stammlösung**

- 7000 ml 96%-iger Alkohol
- 2500 ml Aqua dest.
- 100 ml 25%-ige Salzsäure

## 10 TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b> Überblick über die Einteilung der Mykobakterien in Runyon-Gruppen mit dazugehörigen kulturellen Merkmalen und Mykobakterienspezies (Valentin-Weigand, 2011; modifiziert).....	6
<b>Tabelle 2:</b> Anzahl Tiere mit makroskopischen Veränderungen in Organen und Lymphknoten und Gesamtzahl beprobter Tiere.....	39
<b>Tabelle 3:</b> Anzahl der Paraffinblöcke der Organe und Lymphknoten und die Anzahl der Paraffinblöcke insgesamt.....	41
<b>Tabelle 4:</b> Verteilung der fünf Makro-Muster in den Organen und Lymphknoten .....	50
<b>Tabelle 5:</b> Anzahl und prozentualer Anteil der Präparate mit Vorkommen der einzelnen Komponenten der granulomatösen Entzündung .....	51
<b>Tabelle 6:</b> Anzahl der histologischen Präparate mit Vorkommen der verschiedenen Typen tuberkulöser Läsionen.....	58
<b>Tabelle 7:</b> Vorkommen der Veränderungstypen in den Proben (Anzahl Präparate) im Vergleich zu Gesamtzahl der Präparate.....	58
<b>Tabelle 8:</b> Organe und Lymphknoten, die histologisch auf das Vorkommen von säurefesten Bakterien untersucht wurden mit Angabe der Anzahl der insgesamt untersuchten und der Anzahl der positiven Präparate.....	60
<b>Tabelle 9:</b> Anzahl Präparate mit Vorkommen säurefester Stäbchen in den Lokalisationen innerhalb der Läsionen.....	61
<b>Tabelle 10:</b> Verteilung säurefester Stäbchen in den verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Organe und Lymphknoten (Zahlen entsprechen Anzahl der Präparate)....	63
<b>Tabelle 11:</b> Vorkommen unterschiedlicher Typen tuberkulöser Läsionen und Anzahl davon in der säurefesten Färbung positiven Präparate.....	65
<b>Tabelle 12:</b> Verteilung säurefester Stäbchen in den unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb der Typen tuberkulöser Läsionen. Die Zahlen stehen für die Anzahl der Präparate, in denen innerhalb einer bestimmten Komponente eines Typs säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden konnten („/“ = kommt in diesem Typ nicht vor; „–“ = keine säurefesten Stäbchen darin gefunden).....	65
<b>Tabelle 13:</b> Tagebuchnummer der einzelnen Tiere, Proben, Veränderungstyp und Ergebnisse der säurefesten Färbung nach Fite-Faraco.....	91



# 11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Leber, einzelner, rundlicher, konzentrisch geschichteter und trockener Herd, entsprechend Makro-Muster I; mittels Klotz-Lösung fixiert (Maßstab = 1 cm)...	46
<b>Abbildung 2:</b> Lunge, multiple, kleine und rundliche Herde, entsprechend Makro-Muster II; mittels Klotz-Lösung fixiert (Maßstab = 1 cm).....	46
<b>Abbildung 3:</b> Lymphknoten, multiple unregelmäßig geformte Herde, entsprechend Makro-Muster III; formalinfixiert (Maßstab = 1 cm).....	48
<b>Abbildung 4:</b> Lymphknoten, konfluierende, unregelmäßig geformte und große Teile des Lymphknotens einnehmende Herde, entsprechend Makro-Muster IV; mittels Klotz-Lösung fixiert (Maßstab = 1 cm).....	48
<b>Abbildung 5:</b> Lunge, neben Herden nach Makro-Muster I sind auch Einschmelzungsherde (Hohlräume) entsprechend Makro-Muster V zu erkennen; formalinfixiert (Maßstab = 1 cm).....	49
<b>Abbildung 6:</b> Lunge, einzelner, rundlicher und gelblicher Herd, darum verdichtetes und ödematisiertes Lungengewebe; mittels Klotz-Lösung fixiert (Maßstab = 1 cm).....	50
<b>Abbildung 7:</b> Leber, Ansammlung zerfallender neutrophiler Granulozyten am Rand einer Nekrosezone eines Granuloms; H&E, E 110/09.....	52
<b>Abbildung 8:</b> Lunge, Alveolen großflächig mit eosinophilem Material gefüllt, dazwischen zellreiche Areale mit zentraler Nekrose, am oberen linken Bildrand unverändertes Lungengewebe; H&E, E 322/09.....	53
<b>Abbildung 9:</b> Leber, histologische Erscheinungsform der Tuberkulose Typ 1, rundes Granulom mit: 1 = zentraler Nekrose (Verkäsung), 2 = Verkalkung, 3 = Saum aus Epitheloid- und Riesenzellen, 4 = Lymphozytenzone, 5 = Bindegewebskapsel, außerdem: 6 = unverändertes Lebergewebe, 7 = Herd mit wenigen Makrophagen, 8 = Herd mit vielen Makrophagen, 9 = Herd mit zerfallenden neutrophilen Granulozyten; H&E, E 110/09.....	54
<b>Abbildung 10:</b> Portallymphknoten, histologische Erscheinungsform der Tuberkulose Typ 2, flächige, unregelmäßig verlaufende Nekrosezone, umgeben Epitheloidzellen, Riesenzellen und Lymphozyten; H&E, E 110/09.....	55
<b>Abbildung 11:</b> Mesenteriallymphknoten, histologische Erscheinungsform der Tuberkulose Typ 3a, Epitheloidzellgranulom; H&E, E 320/09.....	56
<b>Abbildung 12:</b> Mesenteriallymphknoten, histologische Erscheinungsform der Tuberkulose Typ 3b, Epitheloidzellgranulom mit beginnender zentraler Nekrose und wenig Verkalkung; H&E, S 602/14.....	57
<b>Abbildung 13:</b> Mesenteriallymphknoten, meistens waren nur einzelne säurefeste Stäbchen in Nekrosezonen zu finden; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco S 128/13...	61
<b>Abbildung 14:</b> Mediastinallymphknoten, einige wenige säurefeste Stäbchen in einer Nekrosezone; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 126/13.....	62
<b>Abbildung 15:</b> Mesenteriallymphknoten, häufig auftretendes Bild mit einem einzelnen säurefesten Stäbchen in einer Riesenzelle; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 415/14.....	63
<b>Abbildung 16:</b> Mesenteriallymphknoten, Übergang von Verkäsung (links) in Verkalkung (rechts) mit Auftreten säurefester Stäbchen in beiden Komponenten bzw. Lokalisationen; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 179/13.....	64
<b>Abbildung 17:</b> Mesenteriallymphknoten, viele säurefeste Stäbchen in einem Verkalkungsherd; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 179/13.....	64
<b>Abbildung 18:</b> Mesenteriallymphknoten, sehr viele säurefeste Stäbchen in Nekrosezone des Veränderungstyps 2; ein solches Bild war nur selten anzutreffen; säurefeste Färbung	

nach Fite-Faraco, E 102/09.....	66
<b>Abbildung 19:</b> Mediastinallymphknoten, zwei säurefeste Stäbchen im Zytoplasma einer mehrkernigen Riesenzelle; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 126/13.....	67
<b>Abbildung 20:</b> Mesenteriallymphknoten, ein säurefestes Stäbchen zwischen Epitheloidzellen; säurefeste Färbung nach Fite-Faraco, S 128/13.....	67

## 12 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Hermanns, danke ich herzlich für die Vergabe des interessanten Themas, die viele Zeit, die er im Zusammenhang mit dieser Arbeit investiert hat und die sehr gute Betreuung. Frau Dr. Miriam Leipzig gilt mein herzlicher Dank für die intensive Betreuung, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Meiner lieben Freundin und Kollegin, Hazal Öztürk, danke ich für die unzähligen aufmunternden Worte, ihre Hilfe beim Bearbeiten der Proben und ihre Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit. Dem Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten danke ich für die Förderung des Forschungsvorhabens "Bovine Tuberkulose im Allgäu" unter der Forschungsnummer (A/13/37).

Allen Mitarbeitern, Assistenten und Doktoranden des Instituts für Tierpathologie danke ich sehr für die herzliche Aufnahme und dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern von Herzen, da sie mit ihrer Unterstützung das alles erst möglich gemacht haben.